



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LAÍS MORAES PAIZ

INFECÇÃO POR AGENTES DAS LEISHMANIOSES, DOENÇA DE CHAGAS E
FEBRE MACULOSA BRASILEIRA EM MAMÍFEROS SILVESTRES DE VIDA LIVRE
EM ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO MUNICÍPIO DE CAMPINAS, SÃO
PAULO

*INFECTION BY AGENTS OF LEISHMANIASIS, CHAGAS DISEASE AND
BRAZILIAN SPOTTED FEVER IN FREE-RANGING WILD MAMMALS FROM AN
ENVIRONMENTALLY PROTECTED AREA OF THE MUNICIPALITY OF
CAMPINAS, SÃO PAULO*

CAMPINAS

2018

LAÍS MORAES PAIZ

INFECÇÃO POR AGENTES DAS LEISHMANIOSES, DOENÇA DE CHAGAS E
FEBRE MACULOSA BRASILEIRA EM MAMÍFEROS SILVESTRES DE VIDA LIVRE
EM ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO MUNICÍPIO DE CAMPINAS, SÃO
PAULO

*INFECTION BY AGENTS OF LEISHMANIASIS, CHAGAS DISEASE AND
BRAZILIAN SPOTTED FEVER IN FREE-RANGING WILD MAMMALS FROM AN
ENVIRONMENTALLY PROTECTED AREA OF THE MUNICIPALITY OF
CAMPINAS, SÃO PAULO*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em Saúde Coletiva, na área de
concentração Epidemiologia

*Thesis presented to the “Faculdade de Ciências Médicas” of the
“Universidade Estadual de Campinas” as part of the requirements for
obtaining the Doctor degree in Public Health, Epidemiology
concentration area.*

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a MARIA RITA DONALISIO CORDEIRO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA LAÍS MORAES PAIZ, E ORIENTADA PELA
PROF.^a DR.^a MARIA RITA DONALISIO CORDEIRO.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-1738/2016; FAPESP, 2014/27212-0; FAPESP, 2014/13049-0; FAPESP, 2016/02572-0
ORCID: 0000-0002-2152-1302

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P167i Paiz, Laís Moraes, 1989-
Infecção por agentes das leishmanioses, doença de Chagas e febre maculosa brasileira em mamíferos silvestres de vida livre em área de proteção ambiental do município de Campinas, São Paulo / Laís Moraes Paiz. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Maria Rita Donalisio Cordeiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Chagas. 2. Leishmaniose. 3. Febre maculosa brasileira. 4. Fauna. 5. Proteção ambiental - Campinas (SP). I. Donalisio, Maria Rita, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Infection by agents of leishmaniasis, Chagas disease and Brazilian spotted fever in free-ranging wild mammals from an environmentally protected area of the municipality of Campinas, São Paulo

Palavras-chave em inglês:

Chagas disease

Leishmaniasis

Brazilian spotted fever

Wildlife

Environmentally protected, Campinas, SP

Área de concentração: Epidemiologia

Titulação: Doutora em Saúde Coletiva

Banca examinadora:

Maria Rita Donalisio Cordeiro [Orientador]

Cáris Maroni Nunes

Guilherme Loureiro Werneck

Simone Baldini Lucheis

Mariângela Ribeiro Resende

Data de defesa: 26-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Saúde Coletiva

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LAIS MORAES PAIZ

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. MARIA RITA DONALISIO CORDEIRO

MEMBROS:

1. PROF^a. DRA. MARIA RITA DONALISIO CORDEIRO

2. PROF^a. DRA. CÁRIS MARONI NUNES

3. PROF. DR. GUILHERME LOUREIRO WERNECK

4. PROF^a. DRA. SIMONE BALDINI LUCHEIS

5. PROF^a. DRA. MARIÂNGELA RIBEIRO RESENDE

Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, na área de Epidemiologia, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 26/02/2018

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, que juntos são responsáveis pelas maiores lições a mim transmitidas.

Agradecimentos

A Deus, a força motriz de cada dia de minha vida.

Aos meus pais e à minha avó, Alice (*in memoriam*), por toda a dedicação e afeto a mim dispensados e por me permitirem crescer em um lar onde valores preciosos me foram transmitidos, como a honestidade e a fé em Deus.

À minha mãe, Zenir, cuja determinação permitiu que conquistasse um diploma de graduação, mesmo em uma difícil realidade em que a formação acadêmica parecia distante. Obrigada, mãe, pelo grande exemplo, apoio e incentivo.

Ao meu pai, Luiz, pelo incentivo e paciência. Agradeço por sempre ter feito o máximo para me proporcionar o que para ele não foi possível, uma formação acadêmica, além de me transmitir o amor e respeito aos animais, motivo da escolha de minha profissão.

Aos meus familiares, em especial aos meus tios (as) e primos (as), dos quais sempre obtive palavras de apoio, incentivo e carinho.

À minha querida orientadora, Rita. Sou grata por acreditar em mim em cada desafio, por me ouvir e conduzir durante esses anos. Seus ensinamentos vão além desta tese: levo comigo, para toda a vida, seu exemplo de humanidade. Sempre paciente, humilde, solícita, gentil e positiva. Obrigada pelo aprendizado!

À Virgínia, a quem agradeço pela confiança, paciência, amizade e por me receber com um carinho maternal. Serei sempre grata!

Aos meus bons amigos de Dourados, em especial à Dauany, ao Fernando e à Isa, por serem sempre uma boa lembrança do que vivemos juntos na infância e adolescência, mas, especialmente, por não deixarem de compartilhar as alegrias e dificuldades da vida, mesmo que estejamos distantes. Vocês são especiais.

Aos amigos queridos com os quais Botucatu me presenteou durante a residência: Carla, Benedito, Raíssa, Gabi, dona Rita e Pricila. Obrigada pelo suporte em um momento em que a amizade foi muito importante.

Ao Benedito, pelo incentivo e auxílio que me foram dados sem medir esforços em incontáveis momentos. Obrigada por me acompanhar nessa “trajetória científica” e torcer sempre pelo meu crescimento. Minha admiração, afeto e gratidão por ser meu confidente, tão cheio de paciência e bom humor!

Aos professores e colegas da pós-graduação, em especial à Aldiane, Letícia, Márcio e Ana Claudia, pelos conhecimentos, disciplinas, papos e almoços no RA compartilhados nesses anos.

À Secretaria Municipal de Saúde de Campinas, especialmente aos profissionais da UVZ, com quem tive oportunidade de trabalhar e que foram fundamentais para a

realização deste trabalho. Obrigada por viabilizarem cada uma das doze semanas de trabalho de campo, fizesse chuva ou sol! Agradeço em especial ao Claudio, Andrea e Ricardo, pela solicitude e interesse neste projeto desde as primeiras de várias conversas e reuniões.

Ao Departamento de Proteção e Bem Estar Animal da Prefeitura de Campinas, pela participação do funcionário Domingos em trabalhos de campo.

Ao Núcleo de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, por viabilizarem as capturas e pelo apoio nas etapas laboratoriais. Agradeço em especial ao prof. José Eduardo Tolezano, e à Dra. Gabriela Motoie, pela confiança, atenção e contribuições a este trabalho. Também à Helena, à Vanessa, ao Roberto, Tatu, Baby, Zé e a todos que em algum momento participaram do projeto, obrigada!

Ao Instituto Adolfo Lutz de Bauru: à Virgínia pelo enorme aprendizado e contribuições nas etapas moleculares e aos colegas e amigos Débora, Barbara, Aghata, Fran, Natássia, Kethlyn, Wesley e Lívia, pelo carinho com que me receberam enquanto estive no laboratório. Obrigada pelos momentos de confraternização, vocês são um exemplo de convivência agradável no ambiente de trabalho!

Ao professor Helio Langoni, pelo apoio técnico e científico nas sorologias. Agradeço ao professor por me manter abertas as portas do laboratório de diagnóstico de zoonoses da FMVZ-UNESP, por todas as oportunidades que me foram dadas ao longo da residência e por ser um exemplo de paixão pela Saúde Pública e pela docência. Agradeço também à Raíssa, Joeleni, Sâmea, Giulia, Talita e Noelle, residentes do laboratório na ocasião em que realizei as sorologias.

À Raissa Saran, à Gabi e à Jô, pela hospedagem durante a etapa laboratorial de Botucatu, pela companhia e amizade.

À SUCEN de São Paulo, em especial ao Adriano Pinter, e à SUCEN de Mogi-Guaçu, em especial ao Celso Eduardo de Souza, pelo apoio científico e técnico nas etapas laboratoriais relativas à FMB.

Agradeço à Dani e ao Edu, por me receberem durante as etapas laboratoriais realizadas em São Paulo. Obrigada pelo acolhimento!

Ao Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, em especial à Dra. Elisa San Martin Mouriz Savani e Regina Fukai, pela realização das sorologias para FMB.

Ao suporte financeiro recebido: à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida nos períodos iniciais de mestrado e doutorado direto; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado (processo nº 2014/13049-0) convertida em bolsa de doutorado direto (processo nº 2016/02572-0), e pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa (processo nº 2014/27212-0).

Aos que não tenham sido mencionados e que de alguma forma estiveram envolvidos nessa pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

“Entre a medicina animal e humana não há uma linha divisória – nem deveria haver.”.

Rudolf Virchow

(1821-1902)

“Com relação a todos os atos de iniciativa e criação, há uma verdade elementar: no exato momento em que alguém se compromete definitivamente, a Providência também se mexe.”.

Johann Wolfgang von Goethe

(1749-1832)

RESUMO

Nas últimas décadas, tornou-se crescente a discussão sobre a participação da fauna silvestre na epidemiologia das zoonoses, especialmente devido à emergência e reemergência de enfermidades infecciosas e parasitárias, a modificações ambientais crescentes e à consolidação da abordagem “Saúde Única”. A área de proteção ambiental (APA) do município de Campinas, estado de São Paulo, sofreu intensas modificações a partir da década de 1960, decorrentes, em sua maioria, de expansão urbana. Neste ambiente degradado, a fauna silvestre passou a coabitar com o homem e animais domésticos, o que pode estar relacionado à ocorrência de zoonoses na APA, como a leishmaniose tegumentar, leishmaniose visceral (LV) e febre maculosa brasileira (FMB). Assim, este estudo objetivou investigar a circulação de agentes dessas três infecções zoonóticas, além do agente da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), entre animais da fauna silvestre da APA de Campinas. Para isso, foram empregadas técnicas sorológicas e moleculares em amostras biológicas colhidas de 82 mamíferos silvestres capturados em 18 áreas da APA entre abril de 2014 e março de 2015. A detecção de anticorpos para *Rickettsia rickettsii*, principal agente da FMB, foi realizada por meio da reação de imunofluorescência indireta em amostras de soro de 54 gambás (*Didelphis* spp.), considerados hospedeiros amplificadores das riquetsias. Um *D. albiventris* (gambá-de-orelha-branca) apresentou título de anticorpos de 128. Adicionalmente, o DNA de riquetsias foi pesquisado em amostras sanguíneas de todos os mamíferos capturados. Não houve detecção molecular, resultado esperado, considerando-se a localização das riquetsias em células endoteliais e o período de riquetsemia, em geral, curto. Por outro lado, verificou-se a circulação de tripanossomatídeos patogênicos entre mamíferos amostrados. Dez animais apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* e cinco exibiram o DNA do parasita em amostras de sangue e/ou pele. O sequenciamento genético permitiu identificar a infecção pelo agente da LV, *Leishmania* (*L.*) *infantum*, em quatro animais (um sagui e três gambás). Um *D. albiventris* apresentou infecção por *Leishmania* subgênero *Viannia*, não sendo possível determinar a espécie do parasita pela análise de dissociação de alta resolução e análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição. O DNA de *T. cruzi* foi detectado em amostras sanguíneas de três *D. albiventris* e um deles exibiu o parasita em amostras colhidas em duas capturas, num intervalo de três meses. Todos os animais infectados pelos agentes das leishmanioses e da doença de Chagas estavam nas proximidades de residências no momento da captura, particularmente em dois condomínios onde há transmissão de LV entre cães. Os resultados reiteram a preocupação crescente com relação à interface fauna silvestre-

homem-animais domésticos em habitats fragmentados. Atividades de vigilância são necessárias para esclarecer outros fatores relativos ao ciclo de transmissão de *T. cruzi* na região da APA, como a fauna de triatomíneos e a infecção em cães, considerados sentinelas ao risco de infecção humana. No que se refere à LV, o programa de controle brasileiro deve considerar as particularidades de cada área de transmissão. Medidas como a eliminação do reservatório canino podem ser ineficazes em áreas como a APA, onde o parasita circula entre animais da fauna silvestre.

Palavras-chave: Chagas; leishmaniose; febre maculosa brasileira; fauna; área de proteção ambiental.

ABSTRACT

In recent decades, there has been a growing discussion about the involvement of wildlife in the epidemiology of zoonoses, especially due to the emergence and reemergence of infectious and parasitic diseases, increasing environmental changes and consolidation of the "One Health" approach. The environmentally protected area (EPA) of the municipality of Campinas, São Paulo State, Brazil, has undergone intense environmental changes since the 1960s, mostly due to urban expansion. In this degraded environment, wild animals cohabit with man and domestic animals, which may be related to the occurrence of zoonoses in EPA, such as cutaneous leishmaniasis, visceral leishmaniasis (VL) and Brazilian spotted fever (BSF). Thus, this study aimed to investigate the circulation of the agents of these three zoonotic infections, in addition to the agent of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*), among free-ranging wild mammals of the EPA-Campinas. For this purpose, serological and molecular techniques were applied in biological samples collected from 82 wild mammals, which were captured in 18 areas of EPA between April 2014 and March 2015. The detection of antibodies to the main agent of BSF, *Rickettsia rickettsii*, was performed by the indirect fluorescent antibody test in serum samples from 54 opossums (*Didelphis* spp.), considered to be amplifier hosts. One *D. albiventris* (white-eared opossum) presented antibody titre of 128. In addition, the DNA of rickettsia was screened in blood samples from all the captured mammals. There was no molecular detection, which was an expected result when considering the location of the agent in endothelial cells and the generally short period of rickettsemia. On the other hand, the infection by pathogenic trypanosomatids was observed among mammals sampled. Ten animals had anti-*Leishmania* antibodies and five presented the DNA of the parasite in blood and/or skin samples. Genetic sequencing allowed the identification of infection by the agent of VL, *Leishmania (L.) infantum*, in four animals (one marmoset and three opossums). Infection by *Leishmania* subgenus *Viannia* was verified in one *D. albiventris*, but it was not possible to determine the parasite species by the analysis of restriction fragment length polymorphism and high resolution melting. The DNA of *T. cruzi* was detected in blood samples from three *D. albiventris*. One of them presented the DNA of the parasite in samples from two captures, conducted at a three-month interval. All animals infected by agents of leishmaniasis and Chagas disease were in close proximity to human dwellings at the time of capture, particularly in two condominiums where there is canine VL transmission. The results raise concern regarding wildlife-man-domestic animals interface in

fragmented habitats. Surveillance activities are necessary to clarify other factors related to the transmission cycle of *T. cruzi* in the EPA, such as the triatomine fauna and the infection of dogs, considered to be sentinels to the risk of human infection. With regard to VL, the Brazilian control program must consider the particularities of each transmission area. Measures such as the elimination of the canine reservoir may be ineffective in areas such as EPA, where the parasite circulates among wildlife.

Keywords: Chagas; leishmaniasis; Brazilian spotted fever; wildlife; environmentally protected area.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- aids – síndrome da imunodeficiência humana
- APA – área de proteção ambiental
- ATLV – área de transmissão de leishmaniose visceral
- BLASTn – *nucleotide basic local alignment search tool* (ferramenta básica de localização de alinhamento local de nucleotídeos)
- CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- cm – centímetros
- CONGEAPA – Conselho Gestor Municipal da Área de Proteção Ambiental
- cPCR – reação em cadeia da polimerase convencional
- DAT – *direct agglutination test* (teste de aglutinação direta)
- DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DTU – *discrete typing unit* (unidades discretas de tipagem)
- EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etileno diamino tetracético)
- EIE – enfermidades infecciosas emergentes
- EIR – enfermidades infecciosas reemergentes
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPIs – equipamentos de proteção individual
- EUA – Estados Unidos da América
- FMB – febre maculosa brasileira
- G – força gravitacional
- g – grama
- GFM – grupo da febre maculosa
- GPS – *Global Positioning System* (sistema de posicionamento global)
- HIV – *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- HRM-qPCR – *high resolution melting real time polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase em tempo real com análise de dissociação de alta resolução)
- HSP70 – *heat shock proteins* (proteínas do choque térmico)
- IAL – Instituto Adolfo Lutz
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
- ICMBio – Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade
- ITS1 – *internal transcribed spacer 1* (espaçador interno transcrito 1)
- KD – Kalazar-Detect™
- kDNA – *kinetoplast DNA* (DNA do cinetoplasto)
- kg – quilograma
- Km – quilômetro
- LCM – leishmaniose cutaneomucosa

- LCPC – leishmaniose cutânea pós-calazar
- LT – leishmaniose tegumentar
- LV – leishmaniose visceral
- LVC – leishmaniose visceral canina
- m – metros
- mg – miligrama
- min – minuto
- mL – mililitro
- MLEE – *multi locus enzyme electrophoresis* (eletroforese de enzima multiloco)
- mM – milimolar
- nDNA – DNA nuclear
- ng – nanograma
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- pb – pares de base
- pH – potencial hidrogeniônico
- PNH – primatas não-humanos
- PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
- qPCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real
- RFLP-PCR – *restriction fragment lenght polymorphism polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase com análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)
- RIFI – reação de imunofluorescência indireta
- rpm – rotações por minuto
- rRNA – *ribosomal ribonucleic acid* (ácido ribonucleico ribossomal)
- seg – segundos
- SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
- SL – solução de Locke
- SMS – Secretaria Municipal de Saúde
- SST – solução salina tamponada
- SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias
- T_m – temperatura de *melting* (fusão)
- TR-DPP® – teste rápido *Dual Path Platform*
- U – unidade
- UNESP – Universidade Estadual Paulista
- UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
- UVZ – Unidade de Vigilância em Zoonoses
- V – volt
- µL – microlitro
- µM – micromolar
- °C – graus Celsius
- 2-ME – 2-mercaptoetanol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Emergência e reemergência de enfermidades infecciosas e a abordagem “Saúde Única”.....	17
1.2. Modificações ambientais e seus impactos na fauna silvestre e na ocorrência de zoonoses	20
1.3. A área de proteção ambiental municipal de Campinas, São Paulo: características e contexto histórico de modificações ambientais e de surtos de zoonoses	22
1.4. <i>Leishmania</i> spp. e leishmanioses	25
1.5. <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas	30
1.6. <i>Rickettsia</i> spp. e febre maculosa brasileira	36
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo Geral	43
3.2. Objetivos Específicos	43
4. MÉTODOS	44
4.1. Considerações éticas, autorizações e apoio financeiro	44
4.2. Desenho e área de estudo	44
4.3. Captura de mamíferos silvestres	46
4.4. Colheita de material biológico	49
4.5. Extração de DNA e avaliação da qualidade de amostras extraídas	52
4.6. Investigação da infecção por <i>Leishmania</i> spp.	52
4.6.1. Técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-<i>Leishmania</i>	52
4.6.1.1. <i>Kalazar-detect</i>TM	53
4.6.1.2. Teste de aglutinação direta	54
4.6.2. Técnicas moleculares para detecção do DNA de <i>Leishmania</i> spp.	55
4.6.2.1. PCR convencional (cPCR) para detecção de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	55
4.6.2.2. cPCR espécie-específica para detecção de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	56
4.6.2.3. qPCR para detecção de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	57
4.6.3. Técnicas moleculares para identificação de espécies de <i>Leishmania</i>	57
4.6.3.1. qPCR com análise de dissociação de alta resolução (HRM-qPCR)	57

4.6.3.2. PCR com análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-PCR)	59
4.7. Investigação da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
4.8. Investigação da infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa brasileira	60
4.8.1. Investigação sorológica em amostras de gambás	60
4.8.2. cPCR para <i>Rickettsia</i> spp. e para o grupo da febre maculosa brasileira	61
4.9. Visualização de produtos amplificados na cPCR	62
4.10. Sequenciamento genético de produtos de cPCR	63
4.11. Análise dos dados	63
5. RESULTADOS	65
5.1. Caracterização da amostra da fauna silvestre	65
5.2. Pesquisa direta de tripanossomatídeos em esfregaços sanguíneos	68
5.3. Qualidade do DNA extraído	68
5.4. Resultados da investigação de infecção por espécies de <i>Leishmania</i>	69
5.4.1. Técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	69
5.4.2. Técnicas moleculares para detecção do DNA de <i>Leishmania</i> (cPCR e qPCR)	71
5.4.3. Técnicas moleculares para diferenciação de espécies de <i>Leishmania</i> (HRM-qPCR e RFLP-PCR)	73
5.4.4. Distribuição geográfica dos animais detectados com infecção por <i>Leishmania</i>	77
5.5. Resultados da investigação de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
5.6. Resultados da investigação de infecção por riquetsias do grupo da FMB	79
5.6.1. RIFI para detecção de anticorpos anti- <i>Rickettsia rickettsii</i>	79
5.6.2. cPCR para <i>Rickettsia</i> spp. e riquetsias do grupo da FMB	79
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÕES	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
9. ANEXOS	124
10. APÊNDICES	136

1. INTRODUÇÃO

1.1. Emergência e reemergência de enfermidades infecciosas e a abordagem “Saúde Única”

Ao longo do século XX grandes avanços foram obtidos no controle de enfermidades infecciosas, o que se deve a fatores como a melhoria no saneamento básico, na conservação de alimentos e ao desenvolvimento de novas vacinas e fármacos (1,2).

A teoria da transição epidemiológica foi introduzida por vários autores, particularmente por Omran em 1971 (3), baseando-se em uma mudança nos padrões de adoecimento e morte das populações. Segundo a teoria, as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morbimortalidade humana para dar lugar a doenças degenerativas e causas externas (3,4), associando-se a uma transição demográfica, com aumento na expectativa de vida (5).

A teoria de Omran, entretanto, foi criticada por generalizar esse processo de transição, que é considerado complexo, dinâmico e, muitas vezes, influenciado por fatores demográficos, socioeconômicos, tecnológicos, culturais, ambientais e biológicos (4–6).

A emergência de doenças infecciosas, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a síndrome da imunodeficiência humana (aids), além da reemergência de enfermidades como a malária e a tuberculose (7–9), fizeram com que a teoria fosse revisitada.

Além disso, características de países da América Latina permitiram a definição de um “modelo polarizado prolongado” de transição epidemiológica, baseando-se (i) na sobreposição da ocorrência de doenças infecciosas e parasitárias com doenças crônico-degenerativas; (ii) na reemergência de algumas enfermidades infecciosas e parasitárias e (iii) em um processo de transição prolongado, sem expectativa de resolução (10). Também se destacam o início tardio da queda de mortalidade e a heterogeneidade entre esses países (6).

São consideradas enfermidades infecciosas emergentes (EIE) aquelas causadas por agentes que passaram a ocorrer em áreas onde anteriormente não eram conhecidos; ou agentes que estavam constantemente presentes em determinada área ou hospedeiro com baixas taxas de ocorrência e que, devido a alguma mudança, tornaram-se mais amplamente

disseminados; ou ainda, agentes que não eram conhecidos e que foram associados a uma nova doença, ou a uma doença cuja etiologia era previamente desconhecida. Já as enfermidades infecciosas reemergentes (EIR) são causadas por agentes que reapareceram em locais onde não mais ocorriam, ou cuja ocorrência havia sido radicalmente reduzida (11).

Cerca de 75% das chamadas EIE que afetam humanos são zoonoses (12), ou seja, são doenças ou infecções naturalmente transmitidas a partir de animais vertebrados para seres humanos e vice-versa (13). Dentre elas, 71,8% têm sua origem associada à fauna silvestre (14). É importante observar, entretanto, que a transmissão de zoonoses constitui uma “via de mão dupla”, onde o homem pode também atuar como fonte de infecção para a fauna, ao que se denomina antropozoonose (15).

São muitos os fatores que podem influenciar a emergência de enfermidades infecciosas e, quando se trata de enfermidades transmitidas por vetores, uma infinidade desses fatores (Fig. 1) pode alterar seus padrões de transmissão ao longo do tempo (11).

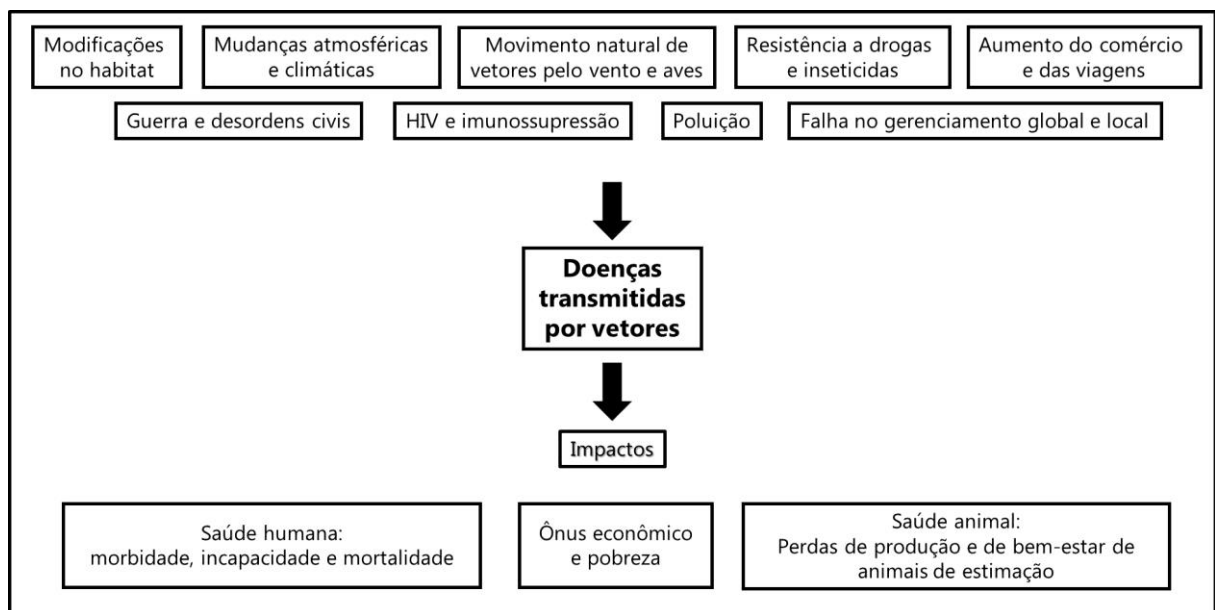


Figura 1. Fatores associados à emergência, reemergência e disseminação de microrganismos com potencial patogênico transmitidos por vetores e seus impactos. Extraída e traduzida de: Harrus & Baneth (11).

Em um ecossistema, esses fatores podem atuar de modo isolado ou simultâneo. O desafio consiste em prevê-los ou revertê-los, a fim de evitar a emergência e reemergência de agentes infecciosos. Para superar esse desafio, uma abordagem colaborativa, multidisciplinar e intersetorial é fundamental (11,15).

Saúde Única ou “*One Health*” é o conceito abrangente que reconhece os vínculos entre a saúde humana, animal e ambiental (15). Prevê uma abordagem holística, colaborativa e multiprofissional, com o objetivo de proporcionar uma saúde ótima aos componentes dessa tríade (Fig. 2), considerando as inúmeras interações que os permeiam (1,15,16).



Figura 2. A tríade “Saúde Única”, demonstrando as bases da abordagem holística que considera as relações entre a saúde humana, animal e ambiental. Tradução: “*Healthy People*”: pessoas saudáveis; “*Healthy environments*”: ambientes saudáveis; “*Healthy animals*”: animais saudáveis. Extraída de: Thompson (16).

O conceito de Saúde Única é relativamente recente, mas o interesse nas relações entre a saúde humana e animal já ocorria no século XIX. O patologista alemão Rudolf Virchow uniu conceitos da medicina humana à medicina veterinária para estudar a parasitose de suínos por *Trichinella spiralis*, cunhando o termo zoonose (17).

Ainda no século XIX e início do século XX, o médico canadense William Osler também demonstrou interesse nessas relações, publicando um de seus primeiros trabalhos com o título “A relação dos animais com o homem”. O médico veterinário americano Calvin W. Schwabe propôs, em 1964, o termo “Uma Medicina” (*One Medicine*) em sua publicação intitulada “Medicina veterinária e saúde humana” (17). “Saúde Única” é a evolução do termo “Uma Medicina” (18).

A partir de 2003 a abordagem “Saúde Única” foi estimulada pelas epidemias de síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2003 e de gripe aviária H5N1 em 2005, que causaram extrema preocupação de autoridades sanitárias quanto à morbimortalidade e aos impactos econômicos em nível global (15).

Em setembro de 2004 a “*Wildlife Conservation Society*” (Sociedade Para a Conservação da Fauna Silvestre) elaborou os Princípios de Manhattan em um simpósio que discutiu a interdisciplinaridade na saúde, formando as bases do conceito “Uma Saúde, Um Mundo” (*One Health, One World*) (17).

A crescente ocorrência de mudanças ambientais e climáticas impulsionou as discussões sobre seus impactos na saúde, especialmente devido à ampliação da interface entre fauna silvestre, homem e animais domésticos, consolidando ainda mais a abordagem Saúde Única. O uso dessa abordagem integrada e multidisciplinar é necessário para compreensão de interconexões existentes entre os eixos da tríade e o ambiente ecológico e social, com seus padrões complexos e em rápida mudança (15,18,19).

1.2. Modificações ambientais e seus impactos na fauna silvestre e na ocorrência de zoonoses

A história da humanidade revela a exploração de paisagens naturais pelo homem, com atividades de domesticação de animais e seu uso para fins econômicos; desenvolvimento de atividades agrícolas, extrativistas e exploratórias; industrialização e comércio; urbanização; e intensa e rápida movimentação de pessoas, animais e bens (11,15,18,19).

Fragmentação ou perda de habitats, reflorestamento e poluição (19,20) são algumas das alterações ambientais e distúrbios ecológicos produzidos por ações antropogênicas, isoladamente ou em combinação com fenômenos naturais (19).

A saúde e equilíbrio da fauna silvestre são extremamente sensíveis às mudanças em ecossistemas (15). A urbanização consiste em um dos mais duradouros processos de fragmentação e perda de habitat (21,22). Nas paisagens urbanizadas, as populações da fauna silvestre distribuem-se heterogeneamente. Algumas se adaptam e agrupam-se ao entorno ocupado pelo homem e por seus animais domésticos, criando interfaces que podem favorecer a transmissão de parasitas zoonóticos (22,23).

Diante deste processo, tanto a fauna silvestre que tem seu habitat fragmentado, quanto o homem e animais domésticos que adentram as novas áreas podem sofrer prejuízos substanciais à saúde. Frequentemente há sobreposição espacial de vetores, hospedeiros e reservatórios infectados, com hospedeiros suscetíveis não imunes (15,19,23).

Para compreensão da epidemiologia de doenças infecciosas, particularmente daquelas transmitidas por vetores, o espaço deve ser, portanto, considerado como categoria de análise, para que processos importantes não sejam ignorados (24). Compreender o impacto das alterações ambientais na emergência de enfermidades é, contudo, bastante complexo (20).

A redução na biodiversidade é uma das consequências das alterações em ecossistemas. Espécies silvestres consideradas especialistas, em habitats ou hábitos alimentares, tendem a desaparecer em áreas alteradas, enquanto espécies generalistas e menos suscetíveis às modificações tendem a tolerar distúrbios ambientais. Algumas conseguem se estabelecer em torno de assentamentos humanos (22), vivendo em estreita associação com o homem e beneficiando-se dela, as quais são denominadas sinantrópicas (25).

Também as doenças infecciosas e parasitárias podem representar uma ameaça à biodiversidade, podendo ocasionar declínios locais repentinos e inesperados na abundância de espécies, particularmente daquelas ameaçadas de extinção (26). Logo, as infecções da fauna silvestre nem sempre são “silenciosas” (16). Como exemplo, têm-se as epizootias de febre amarela que ocorreram no estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2008 e 2009 (27) e no Espírito Santo em 2017 (28), que provocaram o óbito de centenas de primatas não-humanos (PNH).

As mudanças na composição ou diversidade da fauna podem reduzir ou aumentar a probabilidade de parasitas e seus vetores encontrarem hospedeiros suscetíveis (25,29,30). Alguns parasitas, considerados generalistas, são capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros (multi-hospedeiros) (31); outros são especialistas, mas podem “cruzar a barreira” das espécies (11).

Denomina-se *spillover* a dinâmica complexa que envolve processos sucessivos e permite que um agente, a partir de uma população de hospedeiros naturais, se estabeleça e infecte outro táxon (23,32). Esse fenômeno pode possuir caráter zoonótico quando o agente consegue se estabelecer e infectar humanos, embora sua ocorrência não seja comum (32).

Um ambiente rico em biodiversidade, como aqueles preservados, pode permitir uma “diluição” das espécies de hospedeiros competentes de um determinado parasita, particularmente daqueles considerados hospedeiro-especialistas. Consequentemente, há uma redução da prevalência do parasita e do risco de um vetor se alimentar em um hospedeiro competente infectado (25,29,30,33–35). A esse processo denomina-se “*dilution effect*” ou “efeito diluidor”, inicialmente proposto para a doença de Lyme (33).

Por outro lado, a redução da biodiversidade pode permitir a ocorrência de um “efeito amplificador” quando há seleção de espécies de hospedeiros competentes de um determinado parasita e, conseqüentemente, maior probabilidade de um vetor se alimentar em um hospedeiro infectado (25,29,34).

A importância de uma espécie no ciclo de transmissão de um parasita, entretanto, depende de peculiaridades da interação parasita-hospedeiro e de sua estratégia de dispersão. Esses e outros fatores irão determinar sua competência em transmitir o agente (36). Assim, inúmeros parâmetros biológicos devem ser considerados para que uma espécie seja considerada reservatório de um agente infeccioso (37). Na realidade, conceitos mais amplos de reservatório o consideram não como uma espécie animal, mas como um sistema ecológico formado por uma espécie ou por um complexo de espécies ou ambientes responsáveis pela manutenção de um parasita ou agente na natureza, a partir dos quais possa ser transmitido (37,38) em um dado período de tempo ou espaço (39).

Hospedeiros capazes de se infectar e manter a infecção são considerados mantenedores, enquanto hospedeiros amplificadores exibem características de infecção que favorecem a transmissão. Essas características não são estritamente atribuídas a determinadas espécies, sendo intercambiáveis entre si. Ou seja, animais de uma mesma espécie podem atuar como mantenedores ou amplificadores, a depender de diferentes fatores, como o estado de saúde (39).

1.3. A área de proteção ambiental municipal de Campinas, São Paulo: características e contexto histórico de modificações ambientais e de surtos de zoonoses

Nas duas últimas décadas, mudanças significativas ocorreram na dinâmica econômica e demográfica de Campinas, município do estado de São Paulo que no ano de 2017 atingiu uma população estimada de 1.182.429 habitantes (40). Como estratégia para garantir seu desenvolvimento socioeconômico sustentável e visando à proteção e preservação de seu significativo patrimônio ambiental, histórico e cultural, foi criada a área de proteção ambiental (APA) municipal de Campinas (Lei nº 10.850 de 07 de junho de 2001), unidade de conservação situada na região leste do município (Fig. 3).

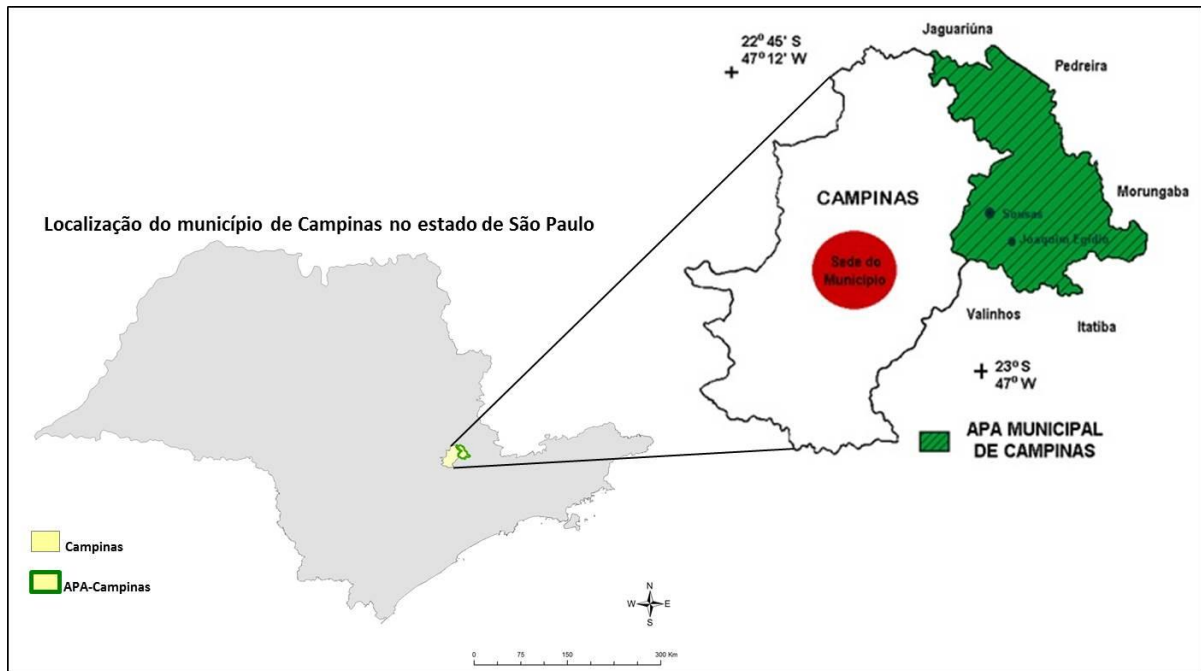


Figura 3. Localização da área de proteção ambiental (APA) do município de Campinas, São Paulo. Adaptado de: Embrapa Monitoramento por Satélite (<http://www.apacampinas.cnpm.embrapa.br>).

Localizada entre as latitudes 22°45'00" e 22°56'00" S e os meridianos 46°52'30" e 47°00'00" W, a APA abrange a região dos subdistritos de Sousas e Joaquim Egídio e dos bairros Carlos Gomes, Jardim Monte Belo e Chácara Gargantilha, estabelecendo limites com os municípios de Jaguariúna, Pedreira, Morungaba, Itatiba e Valinhos. Compreende uma área de 223 Km², que representa 28% do território de Campinas (41,42).

A APA possui clima subtropical e características de relevo diferenciadas, com morros e afloramentos rochosos com altitudes por volta de 850 m a 1.078 m, que se associam à cobertura vegetal natural e a cursos d'água. Seu território abrange o interflúvio dos rios Atibaia e Jaguari (43).

O maior número de fragmentos florestais de Campinas encontra-se na APA, com diversos remanescentes de vegetação nativa e oito dos dez maiores fragmentos de florestas estacionais semidecíduais do município. Em 1999, a soma desses fragmentos representava 30,41% da vegetação remanescente de Campinas e 70,36% da vegetação da APA (43).

A diversidade faunística da APA é composta por mais de 300 espécies de vertebrados terrestres e cerca de 68 espécies de mamíferos silvestres, incluindo espécies ameaçadas de extinção, como onça parda, jaguarundi e bugio (44).

Apesar da riqueza biológica, ao longo das últimas décadas a APA de Campinas tem sofrido impactos significativos, que vão contra as diretrizes de sua criação. Houve intensa urbanização, com implementação de loteamentos e condomínios de alto padrão socioeconômico, além de abertura de novas estradas e duplicação da rodovia estadual Dom Pedro I (41–43,45).

Na década de 1960, foram implementados dois loteamentos na região e a partir da década de 1970 foi observado um processo de desmatamento progressivo e desordenado, que ocasionou a fragmentação de áreas de mata, preservando-se apenas fragmentos residuais, ciliares e de reflorestamento (45). Nas décadas seguintes foram criados vários loteamentos maiores, delimitando-se uma zona de expansão urbana no interior da APA (41).

Além do mercado imobiliário, a APA atrai outros setores econômicos, sendo destino de ecoturismo e de turismo gastronômico. Fernandes (42) denominou o processo de uso das terras da APA como “a mercantilização da natureza”, descrevendo o cenário local:

“[...] A cultura local deixada pelos imigrantes italianos, somada à paisagem bucólica e às construções realizadas ao longo dos séculos, transformaram os distritos em patrimônio ambiental, cultural e histórico de Campinas. Esta notável beleza cênica atraiu (e atrai cada vez mais) novos moradores, além de muitos turistas e “visitantes” em busca de turismo e lazer. [...] Influenciado pela ideologia ambientalista, o mercado apropria-se da *natureza* e a transforma em *mercadoria*, já que esta passa a ser vendida e consumida como um bem raro e, portanto, muito valorizado na sociedade de consumo. É o que presenciamos em Sousas e Joaquim Egídio quando nos deparamos com a massiva presença de condomínios e loteamentos fechados que vendem a aproximação com a *natureza* e também com a forte presença de empreendimentos turísticos e de lazer, sobretudo gastronômicos, que também pregam a aproximação com o “verde”.” (42).

Ao que parece, o processo de modificações ambientais na APA continuará a ocorrer. Recentemente, em dezembro de 2017, a Câmara Municipal de Campinas aprovou o Projeto de Lei Complementar nº 61/17 que modifica a lei de criação da APA, permitindo a intervenção e supressão de vegetação nativa na hipótese de “utilidade pública”, “interesse social” ou “de atividade de baixo impacto”. A mudança visa à continuação da construção da barragem de Pedreira pela secretaria Estadual de Saneamento e Recursos Hídricos.

Conforme abordado no tópico anterior, as alterações ambientais podem impactar na dinâmica de circulação de agentes patogênicos em ciclos enzoóticos na natureza. Surtos de zoonoses têm sido registrados no território da APA desde a década de 1990. Entre fevereiro de 1993 e setembro de 1994 houve um surto de leishmaniose tegumentar (LT) entre moradores da região (45). Quinze anos depois, registrou-se o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral (LV) do município de Campinas, em um cão residente em um dos condomínios implementados durante a década de 1970 (46). Novos casos caninos continuaram a ser registrados nessa área até 2017 (47,48).

O território da APA é, ainda, considerado área de risco de transmissão de febre maculosa brasileira (FMB) (49), definido como local provável de infecção na investigação de casos humanos (50,51). A área é sinalizada por placas que indicam a presença de carrapatos vetores da FMB. Além disso, em 2017 houve um surto de febre amarela na região da APA, com a ocorrência de um caso humano e confirmação do óbito de nove PNH até 24 de fevereiro de 2018 (52).

1.4. *Leishmania* spp. e leishmanioses

Protozoários do gênero *Leishmania* são agentes das leishmanioses, enfermidades humanas consideradas negligenciadas e de complexa epidemiologia (53). Em algumas localidades, as leishmanioses assumiram caráter emergente ou reemergente, devido a fatores como a coinfeção de pacientes imunossuprimidos após a epidemia de HIV e a crescente realização de transplantes, além de consequências de modificações ambientais favoráveis à expansão de sua ocorrência (54–56).

Atualmente, são conhecidas cerca de 20 espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem e 31 são parasitas de mamíferos (57). O protozoário pertence à ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae (58).

Dois subgêneros são importantes do ponto de vista de saúde pública, *Leishmania* e *Viannia*. O primeiro ocorre nas Américas, Europa, Ásia e África, enquanto o subgênero *Viannia* ocorre na região Neotropical (53). Propõe-se a divisão do gênero em duas grandes linhagens filogenéticas ou “seções”, *Paraleishmania* e *Euleishmania*, a última contendo os dois subgêneros citados (59).

Leishmania é um parasita digenético, cujo ciclo de vida envolve diversas espécies de hospedeiros vertebrados mamíferos e hospedeiros invertebrados da ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (57). Cerca de 30 espécies dessa subfamília atuam como vetores (60), pertencentes ao gênero *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África e ao gênero *Lutzomyia* nas Américas (53).

Os flebotomíneos são insetos pequenos conhecidos popularmente como “mosquito-palha” (61), que se deslocam, em geral, por apenas alguns metros, normalmente durante o crepúsculo ou à noite (62). Os criadouros naturais incluem diferentes microhabitats, mas a maioria das espécies é associada a ambientes naturais como florestas, cavernas e fendas em pedras. De um modo geral, adaptam-se bem a locais úmidos, escuros e ricos em matéria orgânica (62).

Ao realizarem repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado por *Leishmania* os flebotomíneos ingerem células, principalmente do sistema mononuclear fagocitário, contendo formas amastigotas do parasita, que se diferenciam em promastigotas multiplicativas no tubo digestivo do vetor. Após a diferenciação em vários estágios morfológicos distintos, o protozoário atinge a forma promastigota metacíclica, regurgitada pelo vetor durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, o parasita é fagocitado e se diferencia em amastigotas replicativas, que rompem as células quando muito numerosas, podendo ser ingeridas por um vetor ou infectarem novos fagócitos (63).

Na Europa, África e Ásia, espécies do subgênero *Leishmania* são responsáveis pela LT, particularmente *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. infantum* e *L. donovani*. Nas Américas, várias espécies pertencentes a ambos os subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, podem ocasionar a enfermidade (53). No Brasil, sete espécies são particularmente associadas: *L. (L.) amazonensis* e as espécies do subgênero *Viannia*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. guyanensis* e *L. lindenberg*. Os principais vetores envolvidos na transmissão da LT no país são *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. migonei* (64).

A LT é a mais comum das leishmanioses, em termos de ocorrência. Em 2015 foram registrados 197.552 novos casos em todo o mundo, mais de 90% na região do Mediterrâneo Oriental e nas Américas. O Brasil encontra-se entre os cinco países com o maior número de casos notificados (65), com 12.690 casos em 2016, notificados nas cinco regiões, sendo 225 (1,8%) no estado de São Paulo (66).

A história da LT no Brasil está intimamente relacionada a atividades humanas em áreas florestais. No início do século XX, a endemia ocorria entre trabalhadores da Ferrovia Novoeste que apresentavam lesões na face popularmente chamadas de “úlceras de Bauru”, “nariz de tapir” ou “ferida brava”. Entretanto, somente em 1909 verificou-se a presença do parasita em lesões cutâneas de trabalhadores de matas do interior de São Paulo (67).

Classicamente, a LT caracteriza-se por uma pápula ou nódulo no local da picada pelo vetor, que evolui lentamente para uma crosta central e uma úlcera de bordas elevadas. A lesão progride gradualmente ao longo de meses ou anos e produz cicatrizes com pigmentação alterada. Com menos frequência, há lesões cutâneas difusas ou disseminadas (53).

A leishmaniose cutâneomucosa (LCM) é considerada uma sequela metastática da LT nas Américas, com extensão das lesões tegumentares para regiões de mucosa (53), podendo ocasionar deformidades e estigma social (64). A enfermidade é de rara ocorrência na Europa, África e Ásia (53). No Brasil, a principal espécie associada à LCM é *L. (V.) braziliensis*, além de *L. (V.) guyanensis* (64).

Enquanto a LT é a leishmaniose de ocorrência mais comum, a LV é a mais severa dessas enfermidades (65). Ocorre pela infecção por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* na Europa, Ásia e África e por *L. (L.) infantum* nas Américas (53). A espécie *L. chagasi* foi descrita em 1937 como responsável por uma forma sistêmica típica das Américas (68). Investigações moleculares e filogenéticas posteriores concluíram que, na realidade, *L. chagasi* e *L. (L.) infantum* constituem a mesma espécie (69–72).

A espécie de flebotomíneo majoritariamente envolvida na transmissão da LV nas Américas, inclusive no Brasil, é *Lu. longipalpis*. A espécie *Lu. cruzi* foi identificada como vetor nos estados do Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (73–75).

Muitas discussões têm sido conduzidas a respeito da capacidade vetorial de outros hospedeiros invertebrados, como pulgas e carrapatos. A espécie *Rhipicephalus sanguineus*, conhecida popularmente como carrapato vermelho do cão, tem sido particularmente estudada (76–83). Contudo, os flebotomíneos permanecem como os únicos vetores biológicos de importância epidemiológica (56,78), embora outras formas de transmissão tenham sido descritas, como a via congênita e transfusional (53,84).

A LV humana varia de quadros assintomáticos ou oligossintomáticos a quadros graves, com sinais de envolvimento sistêmico (53,58). Eventualmente desenvolve-se uma

pigmentação escura da pele, que originou o nome “*kala-azar*” atribuído à doença na Índia, que significa “pele negra” (85).

Quando não tratada adequadamente, a LV pode apresentar letalidade elevada. As drogas de primeira escolha para o tratamento humano são os antimoniais pentavalentes e as de segunda escolha são o desoxicolato de anfotericina B e isetionato de pentamidina. Todas ocasionam efeitos colaterais, que podem ser graves. As formulações lipídicas aprovadas a partir dos anos 2000 são menos tóxicas, como a anfotericina B lipossomal (53,58).

Pacientes que obtêm a cura da LV podem desenvolver lesões na pele e mucosas, especialmente da face, a que se denomina leishmaniose cutânea pós-calazar (LCPC). A LCPC é endêmica em todas as áreas onde a LV é atribuída à *L. (L.) donovani*, ou seja, em áreas na África e Ásia, especialmente no Sudão e em Bangladesh (86).

Em 2015, 14% (3.336/23.804) dos novos casos de LV que foram notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorreram no Brasil, que representa um dos quatro países com o maior número de casos notificados, além da Índia, Sudão e Sudão do Sul (65).

Os primeiros relatos da LV no Brasil datam de 1911 e 1912, quando Carlos Chagas descreveu quadros clínicos de pacientes com esplenomegalia na região Amazônica (87). Em 1913, Migone identificou o parasita em cadáver oriundo do Mato Grosso (88).

Na década de 1990, cerca de 90% dos casos de LV no Brasil ocorriam na região Nordeste, sendo relacionados a baixo nível socioeconômico. Posteriormente, suas áreas de ocorrência se expandiram, inclusive para regiões periurbanas e urbanas de grandes cidades, o que foi associado a um processo de adaptação de *Lu. longipalpis* ao ambiente peridomiciliar (58,89,90). Atualmente, a LV está distribuída em todos os estados e nas cinco regiões brasileiras, incluindo a região Sul, livre da enfermidade até o ano de 2008 (87).

No estado de São Paulo, a LV ocorre em uma intrigante diversidade de cenários epidemiológicos. Foram reconhecidos ao menos três perfis de transmissão nos 132 municípios paulistas que registraram casos autóctones até 2014: (i) 76 apresentaram um perfil “clássico”, com casos caninos e humanos e presença de *Lu. longipalpis*; (ii) em 47 houve transmissão somente entre cães, sete deles sem registro de *Lu. longipalpis*; e (iii) em nove municípios a transmissão estava restrita a humanos, sem registros de *Lu. longipalpis* em três deles (91).

O caráter da transmissão das leishmanioses a humanos depende da ecoepidemiologia particular de cada foco e da espécie do parasita. De um modo geral, a

leishmaniose é considerada uma antroponose em algumas situações, como em casos de coinfeção por HIV, em que os indivíduos podem ser altamente infecciosos para o vetor; e também na LV por *L. (L.) donovani* e na LT por *L. (L.) tropica* (53). Por outro lado, na maioria dos focos de transmissão a LV ocorre como uma zoonose, em que mamíferos silvestres ou domésticos atuam como fontes de infecção para humanos (53,84).

O cão doméstico é considerado o reservatório mais importante, do ponto de vista epidemiológico, nos ciclos de transmissão da LV nas Américas (53,87). Isso se deve a fatores como a proximidade a humanos e sua presença em áreas endêmicas urbanas e periurbanas; ao caráter viscero-cutâneo da infecção canina, frequentemente duradoura e com multiplicação abundante do parasita na derme; e à frequente ocorrência de infecções assintomáticas, o que ocasiona o subdiagnóstico e elevada prevalência de infecção nesses animais (53,84,87,92,93).

A leishmaniose visceral canina (LVC) classicamente cursa com lesões cutâneas, alopecia periocular, onicogribose, alterações hemorrágicas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Eventualmente, a doença renal pode ser a única anormalidade detectada (58,94).

Atualmente, um dos pilares das ações de vigilância e controle da LV recomendadas pelo Ministério da Saúde no Brasil é a eliminação de cães infectados, medida bastante controversa. Os cães são diagnosticados de modo indireto, em inquérito sorológico amostral e censitário (58), utilizando o teste rápido imunocromatográfico *Dual Path Platform* (TR-DPP®, Biomanguinhos, FIOCRUZ, Brasil) em combinação com o teste confirmatório ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, Biomanguinhos, FIOCRUZ, Brasil), de acordo com a Nota Técnica Conjunta nº 01/2011 de 29 de dezembro de 2011.

Há uma crescente discussão sobre a participação do gato doméstico na transmissão e manutenção de *L. (L.) infantum*, especialmente nas Américas (53), onde há relatos da infecção nessa espécie desde 2004 (95). Estudos demonstraram a capacidade de gatos infectados transmitirem o parasita a flebotomíneos vetores (96,97), mas a importância desses animais na epidemiologia da LV ainda é controversa.

Outras espécies de animais domésticos, como galinhas, porcos, cavalos e bois, têm sua importância epidemiológica na transmissão da LV associada ao acúmulo de matéria orgânica, que favorece o desenvolvimento de flebotomíneos vetores (58). As galinhas estão particularmente associadas à epidemiologia da LV, por serem uma das principais fontes alimentares de *Lu. longipalpis* (53,98).

O papel de espécies silvestres como reservatórios de *Leishmania* tem sido discutido. Algumas ainda são pouco estudadas, mas o potencial do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e dos didelfídeos *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) e *D. marsupialis* (gambá comum) como reservatórios de *L. (L.) infantum* tem sido descrito em áreas de transmissão nas Américas (36,53,58). Há relatos ocasionais de manifestações clínicas de LV, semelhantes às que ocorrem em cães, em espécies silvestres de diferentes ordens (99–105). Animais da ordem Rodentia foram considerados reservatórios de espécies de *Leishmania* associadas à infecção humana com manifestações cutâneas e/ou mucosas (36).

É importante ressaltar que as apresentações clínicas da infecção humana por *Leishmania* spp., LT, LCM, LV e LCPC, são assim denominadas e atribuídas a determinadas espécies do parasita, mas o curso da infecção depende também de outros fatores relativos à relação parasita-hospedeiro (63). Essa classificação não deve ser extrapolada para hospedeiros mamíferos silvestres, pois não são conhecidos os sítios de localização e multiplicação do parasita para cada espécie animal (36,106).

Além disso, apesar do aperfeiçoamento alcançado nos últimos anos no conhecimento sobre a infecção por *Leishmania*, há ainda uma escassez de informações sobre a real participação das diferentes espécies de mamíferos na transmissão do parasita. Os reservatórios silvestres na maioria das áreas endêmicas não são conhecidos (53). Dentre os fatores que contribuem para essa escassez de conhecimento estão dificuldades inerentes ao estudo da relação parasita-hospedeiro em mamíferos silvestres, ao isolamento e identificação do parasita nesses animais e à realização de estudos que contemplem todos os critérios para a investigação de reservatórios (36).

1.5. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

Trypanosoma cruzi, bem como *Leishmania*, é um protozoário digenético pertencente à família Trypanosomatidae. O parasita está geograficamente distribuído nas Américas, do sul dos Estados Unidos (EUA) ao sul da Argentina e Chile, incluindo o Brasil (107). É capaz de infectar uma ampla diversidade de hospedeiros em ciclos de transmissão que constituem sistemas complexos, de natureza dinâmica (108,109).

A variedade de cenários epidemiológicos da infecção por *T. cruzi* reflete a plasticidade biológica do parasita (110) e sua natureza generalista, que podem ser

exemplificadas por: (i) sua capacidade de infectar e ser transmitido por dezenas de espécies de triatomíneos; (ii) sua capacidade de infectar centenas de hospedeiros mamíferos e de colonizar quase todos os seus tecidos, o que permite uma multiplicidade de possíveis vias de transmissão; e (iii) sua elevada capacidade de dispersão e ampla distribuição em nichos ecológicos diversos, em quase todos os biomas (39,108–112).

T. cruzi exibe, ainda, uma considerável diversidade genética. Atualmente, considera-se sua classificação em sete unidades discretas de tipagem ou DTUs (*discrete typing units*), denominadas de TcI a TcVI (113), além de TcBat, descrita em morcegos frugívoros em 2012 (114). Há, ainda, evidências de diversidade genética intra-DTU (109,115,116).

Diversos estudos empenharam-se em investigar possíveis associações entre DTUs e características clínicas da infecção humana ou características epidemiológicas, como a associação com hospedeiros e reservatórios específicos. Os resultados são controversos e não há, até o momento, evidências conclusivas dessas associações (107,109).

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é assim denominada em homenagem ao médico sanitarista brasileiro Carlos Chagas, quem primeiro a descreveu, em 1909. Tratava-se de uma enfermidade que afetava o coração de trabalhadores rurais, os quais a chamavam de “avexume” para expressar as sensações de distúrbios cardíacos produzidas. Na ocasião, Chagas também descreveu o agente etiológico, seu vetor e hospedeiro (117).

A doença humana é classicamente descrita em duas fases sucessivas. A fase aguda é resultante de elevada parasitemia, com sinais inespecíficos e complicações em poucos casos (118,119). Na fase crônica a parasitemia é drasticamente reduzida ou inexistente e em 60% a 70% dos casos cursa em uma forma indeterminada assintomática (118,120), embora alguns pacientes desenvolvam lesões durante essa fase (121). Cerca de 30% a 40% dos pacientes cronicamente infectados poderão apresentar a forma cardíaca, digestiva ou mista, com lesões irreversíveis. Complicações neurológicas são mais comuns em indivíduos com aids (120,122).

Anteriormente, a doença de Chagas era considerada um problema de saúde pública restrito à América Latina, mas se expandiu para áreas não endêmicas, particularmente por transmissão por transfusão sanguínea, mas também congênita e por transplante de órgãos, associada a imigrantes infectados oriundos de áreas endêmicas (121–123). Isso porque, com a globalização e o aumento substancial da mobilidade e migração humanas (123–125), verificou-se um número crescente de indivíduos infectados, principalmente imigrantes, no

Canadá, em alguns países da Europa e do Pacífico Ocidental (120,126), além dos EUA, onde há alguns casos crônicos atribuídos à transmissão vetorial (127).

Estima-se que oito milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, especialmente na América Latina (120), onde a doença de Chagas é a principal causa de lesões cardíacas em adultos em idade de trabalho em países endêmicos (128).

A enfermidade é classificada pela OMS como uma doença negligenciada (56) e ocasiona substancial impacto econômico, devido aos custos com o tratamento de indivíduos doentes e com o controle vetorial em algumas áreas (121).

A instituição precoce de terapia nas fases iniciais da doença de Chagas aguda é associada ao sucesso do tratamento. Porém, as opções terapêuticas disponíveis, nifurtimox e benzonidazol, foram desenvolvidas na década de 1970 e possuem algumas limitações, como a toxicidade e impossibilidade de uso em gestantes, o que exemplifica o caráter negligenciado da enfermidade (120,122,129).

Atuam como hospedeiros invertebrados e vetores de *T. cruzi* os insetos popularmente conhecidos como “barbeiros”, pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, particularmente dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (119,130). Classicamente o homem se infecta pela contaminação de uma porta de entrada na pele ou mucosa com formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes de triatomíneos, após o repasto sanguíneo (108).

Quando o triatomíneo realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado ingere formas tripomastigotas circulantes de *T. cruzi*, que irão se diferenciar na forma replicativa epimastigota. No intestino posterior do vetor, diferenciam-se novamente em tripomastigotas metacíclicas infectivas que são depositadas com as excretas na pele do hospedeiro vertebrado, por ocasião do repasto sanguíneo (131,132).

Os parasitas são introduzidos no organismo do hospedeiro vertebrado pela pele quando o indivíduo se coça, ou por membranas mucosas via mãos contaminadas – no caso de hospedeiros mamíferos não humanos isso ocorre quando o animal coça o local com a boca, o que permite a ingestão do parasita. *T. cruzi* invade as células nucleadas de diversos tecidos do hospedeiro vertebrado, onde a forma amastigota se multiplica. Após nova diferenciação em tripomastigota, o parasita rompe a célula e as formas circulantes podem ser ingeridas por um vetor, ou invadir novas células e iniciar um novo ciclo de replicação tecidual (131,132).

A espécie *Triatoma infestans* foi a principal responsável pela transmissão domiciliar da doença de Chagas durante anos em regiões endêmicas (122). Esses vetores – e consequentemente a doença de Chagas – estavam tipicamente associados a áreas pobres e rurais e a habitações de adobe ou pau-a-pique, onde comumente colonizavam frestas na parede ou rachaduras nos telhados, tornando-se ativos durante a noite, quando realizavam o respasto sanguíneo (120,122).

Ações da “Iniciativa Cone Sul de Eliminação de *Triatoma infestans* e da interrupção da transmissão transfusional da tripanossomíase americana”, criada em 1991, permitiram uma redução significativa da transmissão por transfusão sanguínea e a certificação do Brasil como país livre da transmissão domiciliar vetorial por *T. infestans* em 2006 (133).

Esses esforços não foram, entretanto, suficientes para controlar outros mecanismos de transmissão, que passaram a despertar atenção. Há, ainda, transmissão vetorial por outras espécies de triatomíneos, incluindo transmissão vetorial extradomiciliar ou peridomiciliar e domiciliar sem colonização do vetor. Além disso, há surtos regionais de Chagas aguda por transmissão oral em áreas sem a presença de vetores domiciliados (110).

Casos agudos de doença de Chagas por transmissão oral estão associados a apresentações clínicas mais severas e maior mortalidade (108,134–136). Os surtos são associados à ausência de boas práticas de higiene na manipulação e armazenamento de alimentos e à invasão humana de habitats silvestres. A contaminação dos alimentos pode ocorrer por excretas de triatomíneos infectados, ou pelo próprio vetor triturado, além de contaminação por conteúdo de glândulas anais de gambás (*Didelphis* spp.) (136,137).

Os gambás são capazes de manter estágios extracelulares multiplicativos de *T. cruzi* não somente na circulação sanguínea, mas também no lúmen de suas glândulas anais odoríferas (138). O conteúdo das glândulas é eliminado em situações de estresse, sendo possível, portanto, a eliminação do parasita e contaminação do ambiente ao redor (109).

Atualmente, a transmissão oral é a via de infecção humana mais frequente no Brasil, considerando-se os dados do último boletim epidemiológico sobre a doença de Chagas aguda: entre 2000 e 2013, 68,9% dos casos foram atribuídos à transmissão oral. Nesse período, apenas 6,4% dos casos foram associados à transmissão vetorial (extradomiciliar ou sem colonização domiciliar) e somente cerca de 1,0% ocorreu por outras vias, sendo 0,7% por transmissão acidental ou transfusional e 0,4% por transmissão congênita. Alguns valores

podem estar subestimados, pois não se definiu a provável via de transmissão em 23,7% dos casos notificados (139).

A maior frequência dos casos agudos por transmissão oral é registrada na região Amazônica, associados à ingestão de açaí não pasteurizado. Também há casos na região extra-Amazônica, associados à ingestão de caldo de cana contaminado (137,140). Há, ainda, raros relatos de infecção humana atribuída ao consumo ou manipulação de carne de caça (141,142).

É necessário ressaltar que a infecção por *T. cruzi* é considerada uma parasitose primariamente silvestre e a transmissão oral possui caráter habitual no ciclo enzoótico primitivo, devido à ingestão de insetos vetores e de mamíferos (presas) infectados por hospedeiros mamíferos suscetíveis (108,111,112,137). A infecção oral possivelmente também ocorria quando o homem pré-histórico ingeria carne de caça não cozida (143).

A teoria clássica da origem da infecção humana por *T. cruzi* remete há seis a oito mil anos, após a domesticação de pequenos roedores do gênero *Cavia* por povos andinos (111,144). Entretanto, o uso de ferramentas moleculares em estudos paleoparasitológicos produziu evidências de infecção humana anteriores ao período proposto (145). As evidências sugerem que, na realidade, a participação do homem no ciclo de transmissão de *T. cruzi* é possivelmente tão antiga quanto sua existência nas Américas (111,144).

No que diz respeito a mamíferos silvestres, a infecção por *T. cruzi* já foi relatada numa ampla variedade de espécies (119). Considerando que os triatomíneos são generalistas e estão amplamente distribuídos, a transmissão vetorial à fauna de hospedeiros mamíferos pode ocorrer em diferentes estratos florestais (108,137). Esses animais estão constantemente expostos a infecções únicas, mistas ou múltiplas, ou seja, um único hospedeiro pode estar infectado por mais de uma DTU simultaneamente (107,132,146,147).

Várias espécies podem ser identificadas como potenciais reservatórios de *T. cruzi* numa mesma localidade (39). Uma mesma espécie pode, ainda, variar em sua importância no ciclo de transmissão em momentos distintos. Ou seja, as espécies de hospedeiros mamíferos diferem em sua importância epidemiológica de acordo com uma dada escala espaçotemporal (39,137,148–150), de acordo com o conceito mais abrangente de reservatório, abordado anteriormente (37–39).

Marsupiais são os mamíferos mais frequentemente relatados com a infecção em todos os biomas (107,151). Os gambás são referidos como reservatórios por diversos autores e podem exercer esse papel em ciclos de transmissão de *T. cruzi* (109,135).

Tatus, preguiças e tamanduás, animais da superordem Xenarthra, bem como os gambás, são os mais antigos hospedeiros conhecidos de *T. cruzi* (39,152). Possuem importância epidemiológica associada à caça e ingestão de sua carne em algumas regiões, como a Amazônica (39). Os roedores são os maiores alvos de predação dentre os mamíferos e, portanto, podem estar envolvidos na transmissão oral do parasita na natureza (39).

Os quatis (*Nasua nasua*), animais da ordem Carnivora, parecem atuar como reservatórios na região do Pantanal, onde também os javalis (*Sus scrofa*), animais da ordem Artiodactyla, foram associados como reservatórios mantenedores de *T. cruzi* (153,154).

Os morcegos, mamíferos da ordem Chiroptera, podem ser importantes por sua abundância, adaptação ao ambiente antropizado e por compartilharem abrigos com triatomíneos vetores (39). Algumas teorias afirmam que a origem de *T. cruzi* é atribuída à diversificação de tripanossomas de morcegos há milhares de anos (155,156).

A participação de mamíferos domésticos na transmissão de *T. cruzi* também varia de acordo com a localidade (157). Cães atuam como reservatórios na região do Chaco argentino (158). No Brasil, o papel dos cães na transmissão é controverso: frequentemente se expõem ao parasita em ciclos peridomésticos, desenvolvendo anticorpos, mas raramente desenvolvem parasitemia, considerando que o isolamento por xenodiagnóstico ou hemocultura é raro nesses animais (39,152,159). Por esses fatores, além de serem animais aos quais se tem fácil acesso, cães têm sido propostos como sentinelas do risco da infecção humana (39,110,160).

Assim como outras zoonoses de transmissão vetorial, o controle da doença de Chagas é complexo, em especial devido à plasticidade biológica de *T. cruzi*. Dentre as medidas recomendadas pela OMS, têm-se: controle químico e/ou físico vetorial e contínua vigilância entomológica em países endêmicos, mesmo naqueles em que houve a interrupção da transmissão vetorial intradomiciliar, como o Brasil; triagem de bancos de sangue e de doadores de órgãos; tratamento de indivíduos na fase indeterminada inicial; monitoramento de gestantes para vigilância e controle da transmissão congênita, além de exame de recém-nascidos para tratamento precoce; boas práticas de higiene no preparo, transporte, armazenamento e consumo de alimentos (119,120).

1.6. *Rickettsia* spp. e febre maculosa brasileira

As bactérias do gênero *Rickettsia* são responsáveis pelas riquetsioses, zoonoses transmitidas ao homem por carrapatos (161,162). Trata-se de cocobacilos gram-negativos pertencentes à ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae, gênero *Rickettsia*, cujas espécies estão classificadas em diferentes grupos filogenéticos (163).

Embora estejam entre as mais antigas enfermidades transmitidas por vetores conhecidas, ao longo das duas últimas décadas várias espécies de *Rickettsia* patogênicas ao homem foram descritas, além de novos perfis epidemiológicos e expansão de sua distribuição, o que aumentou o reconhecimento da importância dessas infecções (162,164,165).

Espécies do Grupo da Febre Maculosa (GFM) são responsáveis por infecções humanas na África, Ásia, Austrália e Américas (166). A febre maculosa é a mais severa riquetsiose, referida nos EUA como febre maculosa das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain spotted fever*) e no Brasil como FMB (167).

A FMB é uma enfermidade febril aguda, a mais importante dentre as doenças transmitidas por carrapatos no Brasil (168). As primeiras descrições oficiais de casos de FMB datam de 1929, em áreas de expansão urbana da região metropolitana de São Paulo, quando ainda era reconhecida como “typho exanthemático de São Paulo”. Após vários relatos da doença nas duas décadas que se seguiram, houve um período de “silêncio” com pouquíssimos casos registrados (169–171).

A partir do final da década de 1980, houve uma clara reemergência da FMB, com inúmeros casos relatados, especialmente no estado de Minas Gerais (171,172) e de São Paulo (170,171,173), onde foram registrados particularmente na região de Campinas (169,174).

Desde então, observou-se um aumento no número de casos, atribuído em parte à melhoria nas atividades de vigilância, especialmente após tornar-se uma enfermidade de notificação compulsória no estado de São Paulo em 2001 (170) e em todo o país em 2014 (175). Também se verificou a expansão de áreas de transmissão, inclusive para áreas urbanas, além da manutenção de elevadas taxas de letalidade (171).

Em 2016, 139 casos de FMB foram registrados no Brasil, na região Sudeste, em todos os estados; na região Sul, no Paraná e em Santa Catarina; na região Centro-Oeste, no Mato Grosso do Sul; além de um único caso em cada um dos seguintes estados: Rondônia,

Tocantins, Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal (176). No mesmo ano, 45,32% dos casos ocorreram no estado de São Paulo, onde são registrados óbitos todos os anos, desde 2000 (176). Cerca de 10,0% dos casos confirmados em todo o estado entre 2007 a 22 de junho de 2017 ocorreram no município de Campinas (177).

Riquetsias do grupo da FMB infectam o homem quando este é parasitado incidentalmente por carrapatos infectados, o que pode ocorrer em todos os estádios do vetor, larva, ninfa e adulto (170). Entretanto, estima-se que sejam necessárias seis a dez horas de parasitismo para que ocorra a inoculação das riquetsias e, por isso, a transmissão pelo carrapato adulto é menos comum, devido à sua fácil percepção e remoção pelo indivíduo parasitado (171).

Embora a transmissão vetorial seja a via de transmissão humana de maior relevância, é possível a transmissão por transfusão de hemoderivados (178); transmissão acidental pela manipulação do agente em laboratório (179); além de contaminação de portas de entrada na pele com conteúdo gástrico do carrapato, quando do esmagamento do ectoparasita ao retirá-lo (171).

As riquetsias são organismos intracelulares obrigatórios, que se localizam e se multiplicam em células do endotélio vascular, produzindo lesões e, conseqüentemente, alterações clínicas (164,166). O exantema (*rash*), geralmente maculopapular, ocorre predominantemente nas regiões palmar e plantar, podendo evoluir para púrpura hemorrágica, necrose ou gangrena em quadros graves (164,168,180–182).

Entretanto, os sinais clínicos iniciais são bastante inespecíficos e o exantema pode não estar presente (175), dificultando o diagnóstico e a instituição precoce do tratamento com antibioticoterapia, utilizando as drogas cloranfenicol ou doxiciclina (168,183–185).

A espécie *Rickettsia rickettsii* é o principal agente de riquetsioses nas Américas, inclusive no Brasil (163,186). As infecções por esse agente são frequentemente severas, com índices de letalidade elevados (175), especialmente na América do Sul (187), o que está relacionado, dentre outros fatores, ao tempo de diagnóstico e tratamento (181,183,188,189).

São implicados como principais vetores no Brasil, carrapatos da família Ixodidae ou “carrapatos duros”, particularmente do gênero *Amblyomma*, conhecidos popularmente como “carrapato estrela”, “carrapato de cavalo” ou “rodoleiro” (171,190,191).

Amblyomma sculptum é o principal vetor da FMB, anteriormente referido como *A. cajennense*. Após revisão de sua taxonomia, definiu-se a nomenclatura *A. cajennense sensu lato* (s.l.), referindo-se a um grupo de seis espécies: *A. cajennense sensu stricto* (s.s.), *A. interandinum*, *A. mixtum*, *A. patinoi*, *A. sculptum* e *A. tonelliae* (192).

A. cajennense s.s. é encontrado na região Amazônica, enquanto *A. sculptum* ocorre em áreas de floresta pluvial de altitude, no nordeste da Argentina, Bolívia, Paraguai e, no Brasil, nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (192).

No estado de São Paulo, *A. sculptum* e *A. dubitatum* são os vetores da FMB em áreas de Cerrado e Mata Atlântica devastada. A espécie *A. aureolatum* é endêmica na Floresta Pluvial Atlântica e responsável pela transmissão na região metropolitana de São Paulo (171,191).

Há relatos de detecção de riquetsias em *R. sanguineus* em áreas endêmicas para FMB no Brasil (186,193–195). Contudo, não foi comprovada a transmissão de *R. rickettsii* a humanos por essa espécie de carrapato, que raramente os parasita (196,197).

No Brasil, outras espécies de riquetsias vêm sendo investigadas e algumas foram associadas à infecção humana, inclusive com a descrição de novas cepas. Em 2009, foi descrita *Rickettsia* spp. cepa Mata Atlântica, intimamente relacionada à *R. parkeri* e *R. africae* (188), com casos relatados em São Paulo, em Santa Catarina e na Bahia (183,188,189,198,199). A espécie de vetor associada à transmissão é *A. ovale*, distribuída em áreas de Floresta Atlântica submontanhosa e na região litorânea do país (171,188,200).

A espécie *R. parkeri* foi reconhecida como agente da febre maculosa nos EUA, transmitida por *A. maculatum* (201) e, na América do Sul, em países como Uruguai e Argentina, cuja transmissão é associada à espécie de carrapato *A. triste* (202–205).

A importância epidemiológica de *R. parkeri* tem sido sugerida no Brasil, devido à sua detecção em carrapatos *A. triste*, inclusive em áreas com casos humanos de FMB, particularmente no bioma Pampa, mas também no Pantanal (206,207) e no estado de São Paulo (208). *A. tigrinum* (209) e *A. dubitatum* (210) também foram detectados com a infecção e canídeos silvestres foram associados a ciclos enzoóticos no Pampa brasileiro (211). A espécie *R. felis* também foi relacionada à infecção humana no Brasil. (172,212–215).

Os carrapatos atuam não somente como vetores, mas como hospedeiros e reservatórios de *R. rickettsii*. Além da infecção por repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, a infecção entre carrapatos é mantida por transmissão transovariana e transestadial (171,216).

O ciclo biológico dos carrapatos vetores é trioxênico. A fêmea adulta fecundada e ingurgitada ovipõe cerca de 5.000 a 8.000 ovos e morre. Quando há transmissão vertical, em cerca de 30 dias eclodem larvas (“micuins”) infectadas, que podem se alimentar e infectar um hospedeiro vertebrado. Larvas livres da infecção podem adquiri-la quando realizam o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado. A muda para ninfa e adulto ocorre no solo e, bem como as larvas, ambos os estádios alimentam-se de sangue de hospedeiro vertebrado, podendo transmitir ou infectar-se com as riquetsias (171,216).

R. rickettsii é patogênica ao carrapato, infectando inicialmente as células epiteliais de seu intestino médio, multiplicando-se e invadindo sua hemocele. A partir daí, se multiplica em outros tecidos, incluindo as glândulas salivares e os ovários, por onde é transmitida ao hospedeiro vertebrado e à prole, respectivamente (216). Embora consiga sustentar a infecção por múltiplas gerações sucessivas, o número de carrapatos infectados decresce a cada geração.

Portanto, os hospedeiros vertebrados possuem um papel fundamental na manutenção de *R. rickettsii* na natureza, permitindo a infecção de novas linhagens de carrapatos, particularmente os hospedeiros amplificadores, que exibem alta transmissibilidade ao vetor (217). No Brasil, ao menos duas espécies da fauna silvestre são incriminadas como hospedeiros amplificadores: as capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e os gambás. Estes últimos são abundantes em áreas endêmicas de FMB, podendo ser infestados por um grande número de estádios imaturos de carrapatos vetores (170).

As capivaras são um dos principais hospedeiros de *A. sculptum*. Bem como os gambás, são prolíficas e suscetíveis à infecção por *R. rickettsii* (167). Entretanto, foram especialmente associadas à epidemiologia da FMB após um substancial desequilíbrio populacional após o aumento de áreas de plantação de cana-de-açúcar (218,219), que ocuparam grandes extensões de terra, substituindo matas ciliares e remanescentes de matas. A plantação em larga escala cresceu substancialmente no Brasil, particularmente em São Paulo, o que se deve principalmente à demanda doméstica por etanol (220).

A cana serve de fonte alimentar para as capivaras que habitam as áreas fragmentadas pelas plantações. Em várias áreas do Brasil as capivaras são consideradas uma

“peste agrícola” por produtores rurais (221), invadindo áreas de plantação em busca de alimentos, após a fragmentação de seu habitat natural. Esse processo, por sua vez, influencia a dinâmica de transmissão de agentes que circulam entre esses animais, como as riquetsias (218). Há aglomerados (*clusters*) geográficos e temporais de casos humanos de FMB associados à presença de capivaras (166,222).

Os equinos também possuem importância na epidemiologia da FMB por atuarem como os principais hospedeiros de todos os estádios do vetor *A. sculptum*, seguidos da anta (*Tapirus terrestris*) e das capivaras (171).

Carnívoros, em especial o cão doméstico, são os principais hospedeiros de carrapatos adultos das espécies *A. aureolatum* e *A. ovale*, desempenhando o importante papel de carrear os carrapatos para o domicílio a partir de áreas de mata (171,223).

Os cavalos e os cães domésticos são propostos como animais sentinelas ao risco de infecção humana, ou seja, a detecção de anticorpos nesses animais indica a circulação de *R. rickettsii* em determinada localidade e período de tempo (224–229).

Aves passeriformes, especialmente o sabiá-laranjeira (*Turdos rufiventres*) e o olho-de-fogo (*Pyriglena leucoptera*), e, com menor frequência, algumas espécies de roedores, atuam como hospedeiros primários dos estágios imaturos de *A. aureolatum*. Roedores e carnívoros são os hospedeiros mais frequentes de larvas e ninfas de *A. ovale* (171,223).

Evitar o contato com carrapatos é a principal medida preventiva para FMB (166). É recomendado que, diante da necessidade de visitar áreas infestadas, se utilize barreiras físicas, como calças e botas lacradas com fitas adesivas de dupla face; ou químicas, como roupas impregnadas com repelentes. Posteriormente, o corpo deve ser vistoriado quanto à presença de carrapato que, caso encontrado, deve ser retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pinça (171).

A detecção precoce de casos suspeitos para estabelecimento de tratamento adequado e redução da letalidade também constitui uma importante medida de vigilância e controle da FMB. A investigação de surtos para determinação dos locais prováveis de infecção é outro pilar da vigilância epidemiológica. Além disso, medidas de educação em saúde efetivas são fundamentais para que a população conheça os locais de ocorrência de casos ou de carrapatos vetores e, conseqüentemente, de risco de infecção. Os profissionais de serviços de saúde também devem ser capacitados para a suspeição dos casos (171,182,230).

2. JUSTIFICATIVA

A APA de Campinas faz parte do cenário cada vez mais frequente de modificações de origem antropogênica em ecossistemas. A expansão urbana do município para o interior do território da APA – embora incompatível com as diretrizes de uma área ambiental protegida – permitiu o desenvolvimento de uma intensa interface entre a fauna silvestre, o homem e seus animais domésticos. Há uma preocupação crescente com essa relação de proximidade em ambientes degradados, que é permeada por alterações que podem aumentar o risco de ocorrência de infecções zoonóticas (16,19,231).

Os surtos de zoonoses em humanos e cães que passaram a habitar a APA, associados à história de criação e ocupação dessa área, parecem reiterar os riscos à saúde animal, humana e ambiental como consequência de alterações em ecossistemas. Entretanto, são múltiplos e complexos os fatores envolvidos na transmissão de zoonoses, particularmente daquelas transmitidas por vetores (11). Esses fatores permanecem pouco elucidados na APA, em especial aqueles inerentes à fauna silvestre, devido às dificuldades no estudo de animais de vida livre.

O projeto de pesquisa desenvolvido nesta tese foi inicialmente proposto para investigação de um ciclo enzoótico de *Leishmania* na APA-Campinas, em especial do agente da LV, *L. (L.) infantum*. As particularidades ecoepidemiológicas do foco de LV em cães de Campinas despertaram a necessidade de investigar a ocorrência do parasita em mamíferos da fauna silvestre e de esclarecer o papel desses animais nessa área de transmissão.

Dentre essas particularidades, pode-se citar: os casos autóctones de LV do município estão restritos, desde 2009, a cães que habitam uma área geográfica contígua de dois condomínios habitacionais situados no interior da APA; embora a enzootia canina geralmente preceda à ocorrência de casos humanos em áreas endêmicas no Brasil (58), até janeiro de 2018 não houve notificações de LV humana em Campinas (47); a incidência e prevalência da infecção em cães e a densidade de *Lu. longipalpis* nesse foco de transmissão são inferiores às da maioria das áreas endêmicas para LV no país (48).

Resultados preliminares obtidos durante a investigação da infecção por *Leishmania* motivaram a ampliação do projeto de pesquisa, com transferência de nível de mestrado para doutorado. A detecção do parasita *Trypanosoma rangeli* atentou para a possível

circulação do agente da doença de Chagas, *T. cruzi*, considerando-se que os dois agentes se sobrepõem em sua distribuição geográfica e competem biologicamente por vetores do gênero *Rhodnius* e por hospedeiros animais, especialmente marsupiais (232).

Optou-se, ainda, por investigar os mamíferos capturados quanto à ocorrência de infecções por agentes da FMB, considerando-se (i) o esforço para captura e amostragem de animais da fauna local; (ii) o conhecimento escasso da infecção na fauna silvestre, devido a não inclusão desses animais na rotina de atividades de vigilância epidemiológica; e (iii) a importância epidemiológica da FMB em Campinas, onde foi notificado o maior número de casos humanos do estado de São Paulo no período de 2007 a junho de 2017 (177), que ocorreram inclusive na região da APA (50,51).

A consolidação de abordagens multidisciplinares e abrangentes para o enfrentamento de problemas de saúde pública demonstra a necessidade de se considerar a fauna silvestre em ciclos de transmissão de microrganismos com potencial patogênico (233). O desconhecimento dos agentes que circulam entre a fauna de um determinado local, particularmente quando em contato com o homem, pode impedir a avaliação adequada dos riscos e a adoção de medidas efetivas para prevenção e controle de zoonoses (234).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a circulação de agentes das leishmanioses, doença de Chagas e febre maculosa brasileira entre mamíferos silvestres de vida livre da área de proteção ambiental municipal de Campinas, estado de São Paulo.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a exposição dos mamíferos silvestres amostrados aos agentes das leishmanioses e a exposição de gambás à *R. rickettsii*, principal agente da FMB, por detecção de anticorpos;
- Pesquisar a infecção por *Leishmania* spp., *T. cruzi* e *Rickettsia* spp., particularmente riquetsias do grupo da febre maculosa, pela detecção de fragmentos do DNA desses agentes em amostras biológicas (sangue e/ou pele) dos mamíferos silvestres capturados;
- Analisar, qualitativamente, o uso de dois diferentes pares de iniciadores (*primers*) para a detecção de fragmentos do DNA de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em amostras biológicas de mamíferos silvestres com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional;
- Comparar, de modo qualitativo, o uso da técnica da PCR em tempo real em relação à PCR convencional para detecção do agente etiológico da leishmaniose visceral, *L. (L.) infantum*, em amostras sanguíneas;
- Descrever as espécies animais que apresentarem infecção pelos agentes estudados e ilustrar os locais de capturas de mamíferos infectados.

4. MÉTODOS

4.1. Considerações éticas, autorizações e apoio financeiro

O projeto de pesquisa foi desenvolvido mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (nº 3296-1; Anexo 1) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por meio do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO, autorizações nº 42926-1 e 42926-2; Anexo 2).

O Conselho Gestor Municipal da APA de Campinas (CONGEAPA) foi informado sobre a realização da pesquisa (protocolo nº 2014.10.11977; Apêndice 4). A Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Campinas emitiu autorização (nº 019/2014) referente à participação de profissionais do Departamento de Vigilância em Saúde do município nos trabalhos de campo, particularmente da equipe responsável pelo programa de controle da leishmaniose da Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) (Anexo 3).

Foram solicitadas, ainda, autorizações a cada um dos responsáveis pelas propriedades particulares (condomínios ou propriedades rurais) nas quais estavam situados os fragmentos de mata armadilhados. Foi entregue à comunidade um documento informativo a respeito da LV e do projeto de pesquisa, elaborado em parceria com a UVZ (Apêndice 3).

O projeto de pesquisa foi desenvolvido com recursos concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sendo: auxílio à pesquisa regular, processo nº 2014/27212-0; bolsa de mestrado, processo nº 2014/13049-0; e bolsa de doutorado direto, processo nº 2016/02572-0. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

4.2. Desenho e área de estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico transversal, com investigação sorológica e/ou molecular da ocorrência de infecções por *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Rickettsia* spp. em animais de vida livre da fauna silvestre da APA de Campinas, São Paulo.

A amostra foi constituída pela totalidade de animais silvestres capturados em localidades no interior da APA, no período do estudo. Testes estatísticos para o delineamento amostral não foram aplicados, uma vez que há escassez de dados a respeito da infecção por esses agentes nas diferentes espécies silvestres e da população total de mamíferos na região.

Com auxílio do programa *Google Earth* (Google®, versão 7.1.2.2041, compilação em 2013) foram selecionadas 18 diferentes áreas do território da APA para armadilhamento, baseando-se em critérios como localização, tamanho e distância da área de mata a áreas urbanizadas, sua proximidade a curso hídrico, além de facilidade de acesso por estradas. Essas áreas estão ilustradas na Figura 4, elaborada no *software ESRI® ArcGIS™ 10.0, ArcView Licence Type* (1999-2010 ESRI Inc), utilizando base cartográfica do município, obtida na página da internet do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (www.ibge.gov.br).

Os fragmentos florestais e recursos hídricos da APA foram mapeados pelo médico veterinário Claudio Luiz Castagna, da UVZ-SMS-Campinas, por meio de um Sistema de Informação Geográfica com o programa MapInfo, utilizando-se uma camada matricial de foto aérea da APA obtida em 2007. Sobrepos-se uma camada vetorial com os remanescentes de Mata Atlântica de São Paulo, produzida pelo projeto SOS Mata Atlântica e obtida na página da internet do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (www.inpe.br).

Denominou-se “área de transmissão de leishmaniose visceral” (ATLV) a área localizada em um raio de 1.000 m dos dois condomínios habitacionais onde ocorrem os casos caninos de LV. Embora essa delimitação seja superior ao raio de vôo de *Lu. longipalpis*, em geral inferior a 500 m (235), optou-se por ampliar a área de potencial transmissão, devido à ausência de informações sobre a infecção de mamíferos silvestres nessa localidade, à presença de conexões entre áreas de mata e ao fato de todos os casos de LVC notificados em Campinas ocorrerem no interior dessa área.

Seis das 18 áreas de armadilhamento encontram-se no interior da ATLV, na zona urbana da APA (Fig. 4): quatro nos condomínios onde foram notificados os casos de LVC (condomínio A e B; nº 15-18); uma em propriedade rural vizinha ao condomínio B (nº 7); e uma em área de mata fragmentada por instalações do gasoduto Bolívia-Brasil (nº 8). Outras três áreas (nº 9, 10 e 11) são caracterizadas como rurais e estão próximas à ATLV. As demais constituem fragmentos de mata em propriedades rurais distantes da zona urbana.

Em oito áreas (nº 1, 3, 4, 5, 6, 7, 12 e “condomínio B”) situam-se remanescentes de Mata Atlântica, quatro deles situados em grandes fragmentos descritos por Santin (43):

duas áreas no fragmento “mata Ribeirão Cachoeira” (nº 5 e 6), uma no fragmento “Faz. Recreio” (nº 1) e uma no fragmento “Faz. Santana” (nº 7). Nove das 18 áreas (nº 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13 e “condomínio B” nº 18) estão à margem do rio Atibaia e três (nº 1, 3 e 4) do rio Jaguari.

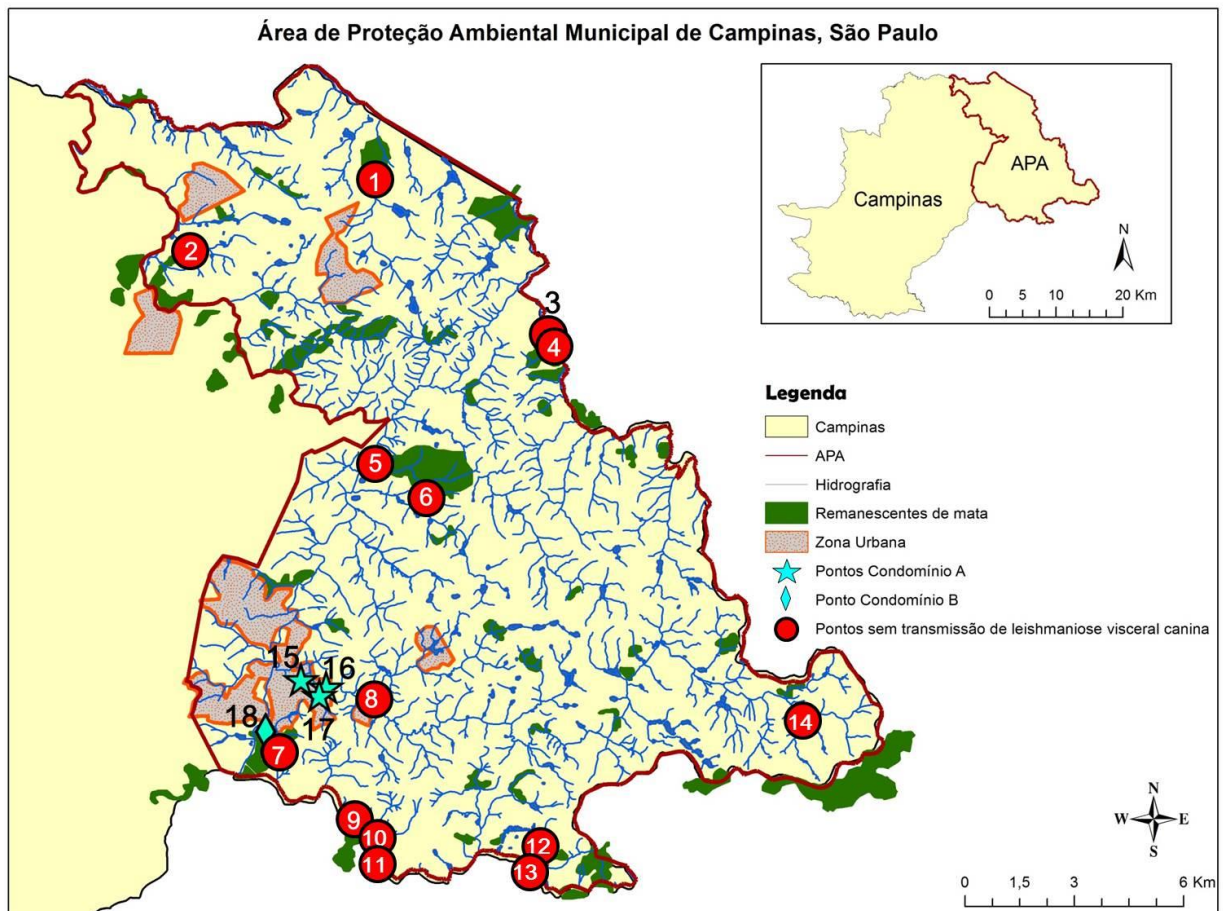


Figura 4. Mapa da área de proteção ambiental de Campinas, com destaque para os fragmentos remanescentes de mata, zona urbana e hidrografia, além da distribuição das dezoito áreas selecionadas para captura de mamíferos silvestres. Campinas, São Paulo, 2013.

4.3. Captura de mamíferos silvestres

As capturas de mamíferos silvestres foram realizadas durante um ano, entre abril de 2014 a março de 2015, em doze semanas de trabalho de campo, sendo uma semana por mês e três por estação do ano. As atividades foram realizadas com o auxílio de profissionais da UVZ-SMS. As armadilhas foram gentilmente cedidas por pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo, que também realizaram o treinamento da equipe de campo.

A cada semana, durante três dias e três noites consecutivas, 03/18 áreas selecionadas na APA foram armadilhadas simultaneamente. Utilizou-se como critérios de seleção das três áreas: (i) uma necessariamente deveria estar situada dentro da ATLV; (ii) outra deveria ser externa à ATLV e à zona urbana da APA; e (iii) a terceira foi selecionada por sorteio dentre as áreas restantes. Portanto, as 18 áreas não foram armadilhadas com a mesma frequência, objetivando-se uma amostragem mais representativa de áreas de mata preservadas, de áreas urbanizadas e de áreas situadas no foco de LVC.

Em cada uma das três áreas foram instaladas 20 armadilhas de metal dobráveis do tipo *tomahawk* (Fig. 5) contendo iscas de banana e carne de frango, sendo dez com as dimensões de 30 x 21 x 20 cm e dez com 55 x 20 x 20 cm. As 60 armadilhas (20/área) foram distribuídas em transectos lineares ao longo do solo, com distância de 10 a 20 metros (236), sendo verificadas a cada dia.



Figura 5. Armadilhas do tipo *tomahawk* utilizadas para captura de pequenos mamíferos silvestres. A: armadilha com gatilho preso ao gancho contendo a isca, permitindo a entrada no animal; B: armadilha desarmada, com gatilho solto, servindo de trava para impedir a abertura e fuga do animal.

Esperava-se capturar espécies de pequenos mamíferos pertencentes ao inventário de mamíferos silvestres da APA de Campinas (Quadro 1), realizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) por observação direta dos indivíduos (237), com exceção de quirópteros, devido à metodologia de armadilhamento utilizada.

Ressalta-se que espécies que diferem da classe Mammalia não foram amostradas nesse estudo e, quando estes animais eventualmente adentraram as armadilhas, foi efetuada soltura imediata no local, sem que fosse realizada qualquer intervenção. Além disso, pequenos roedores também foram excluídos da amostragem, devido a dificuldades quanto à captura nos modelos de armadilhas utilizados, bem como quanto à identificação das espécies e à colheita de amostra sanguínea em quantidade suficiente sem realização de eutanásia.

Quadro 1. Espécies pertencentes ao inventário da fauna silvestre da área de proteção ambiental do município de Campinas, São Paulo, excluindo-se animais da ordem Chiroptera.

Classificação	Nome popular	Nome científico
Ordem Artiodactyla		
Família Cervidae	Veado-mateiro	<i>Mazama americana</i>
Ordem Carnivora		
Família Canidae	Cachorro-do-mato	<i>Cerdocyon thous</i>
Família Felidae	Onça-parda, suçuarana	<i>Puma concolor</i>
	Jaguaritica, oncelote	<i>Leopardus pardalis</i>
	Gato-maracajá	<i>Leopardus wiedii</i>
	Jaguarundi	<i>Puma yagouaroundi</i>
Família Mustelidae	Irara	<i>Eira barbara</i>
	Lontra	<i>Lontra longicaudis</i>
	Furão	<i>Galictis cuja</i>
Família Procyonidae	Guaxinim, mão-pelada	<i>Procyon cancrivorus</i>
Ordem Cingulata		
Família Dasypodidae	Tatu-galinha, tatuê	<i>Dasypus novemcinctus</i>
	Tatu-peludo, tatupeba	<i>Euphractus sexcinctus</i>
Ordem Didelphimorphia		
Família Didelphidae	Cuíca da cauda pelada	<i>Caluromys philander</i>
	Cuíca-de-quatro-olhos	<i>Philander opossum</i>
	Gambá-de-orelha branca	<i>Didelphis albiventris</i>
	Gambá	<i>Didelphis marsupialis</i>
Ordem Lagomorpha		
Família Leporidae	Tapeti, lebre	<i>Sylvilagus (Tapeti) brasiliensis</i>
Ordem Primates		
Família Atelidae	Bugio, barbado, guariba	<i>Alouatta fusca</i>
Família Cebidae	Macaco-prego	<i>Cebus apella</i>
Família Callitrichidae	Sagui-de-tufo-branco	<i>Callithrix jacchus</i>
Família Pitheciidae	Sauá, guigó	<i>Callicebus (Callicebus) personatus</i>
Ordem Rodentia		
Família Cuniculidae	Paca	<i>Agouti paca</i>
Família Dasyproctidae	Cutia-amarela	<i>Dasyprocta azarae</i>
Família Caviidae	Preá	<i>Cavia aperea</i>
	Capivara	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>
Família Myocastoridae	Ratão-do-banhado	<i>Myocastor coypus</i>
Família Muridae	Camundongo	<i>Mus musculus</i>
Família Cricetidae	Rato-do-mato	<i>Bolomys lasiurus</i>
	Rato-do-mato	<i>Calomys laucha</i>
Família Erethizontidae	Ouriço-cacheiro	<i>Sphiggurus villosus</i>
Família Sciuridae	Caxinguelê, serelepe	<i>Sciurus (Guerlinguetus) aestuans</i>

Classificação taxonômica Segundo Roskov *et al.* (238). Fonte: Embrapa (237).

4.4. Colheita de material biológico

A captura, contenção, manipulação e colheita de amostras biológicas dos mamíferos silvestres foram realizadas de acordo com diretrizes para uso de mamíferos selvagens em pesquisa, elaboradas pela *American Society of Mammalogists* (239).

Para a colheita de amostra biológica, os animais foram submetidos à contenção física manual. As drogas cetamina (Quetamina[®], Vetnil, Brasil) e midazolam (Dormire[®], Cristália, Brasil) foram utilizadas quando a contenção manual não foi suficiente, mediante estimativa visual e manual do peso corpóreo, em doses intramusculares de, respectivamente, 10 mg/kg e 1-2 mg/kg (236,240). A recuperação anestésica ocorreu no interior da armadilha.

Cada mamífero capturado recebeu identificação por meio de microchip agulhado (Microchips Brasil[®], Brasil), aplicado de modo subcutâneo entre as escápulas com aplicador do tipo seringa, de acordo com instruções do fabricante (Fig. 6). Os microchips permitiram a identificação de mamíferos que foram recapturados, tendo em vista que sua presença era verificada com auxílio de um leitor de microchip (modelo AT01, Animal Tag[®], Brasil; Fig. 7) antes da colheita de amostra. Uma nova amostra biológica foi colhida somente quando o intervalo entre a primeira e a segunda captura foi igual ou superior a 14 dias.

Uma avaliação clínica do estado geral de saúde de cada animal capturado foi realizada para verificar a ocorrência de sinais clínicos aparentes, como a presença de lesões cutâneas. Não se realizou exame físico e clínico completos (ex.: aferição de parâmetros como temperatura corpórea, frequência cardíaca, etc.), a fim de evitar um período prolongado de manipulação e contenção, minimizando o estresse do animal.

O fluxograma de colheita e processamento das amostras está ilustrado na Figura 8. Após tricotomia e antissepsia local com álcool 70%, foram colhidos de dois a cinco mL de sangue, de acordo com o porte do animal, a partir de punção da veia caudal ou femoral. A amostra sanguínea foi parcialmente acondicionada em um tubo contendo o anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), destinada à confecção de esfregaço sanguíneo ainda no local e à posterior extração de DNA; a outra parte foi armazenada em tubo sem anticoagulante, para obtenção do soro sanguíneo.

Adicionalmente, realizou-se biópsia de pele íntegra da cauda e de lesões cutâneas ou manchas hipocrômicas, quando presentes, de acordo com o procedimento padrão

operacional do IAL (P-NPS-05, 22/09/2014). Após antissepsia com álcool 70% e anestesia local com lidocaína 1,0%, realizou-se a colheita de fragmento de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro e 30,0 mg de peso (241) com auxílio de lâmina de bisturi, que foi acondicionado em microtubo *DNAse-free* para posterior extração de DNA.

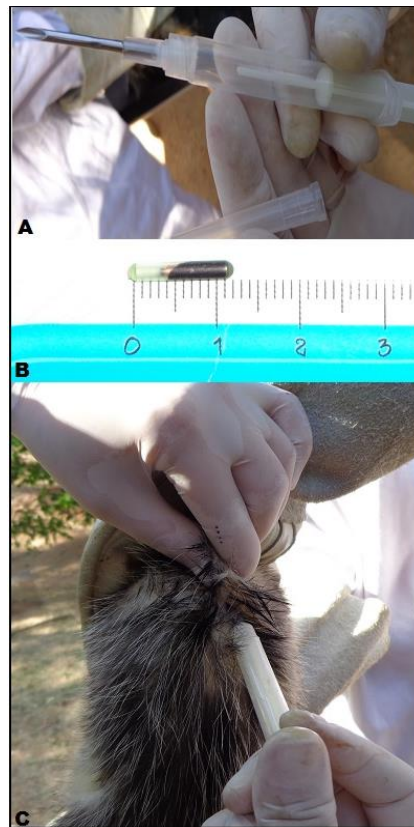


Figura 6. Microchipagem de mamíferos silvestres capturados. A: aplicador do tipo seringa com microchip agulhado acoplado; B: microchip, contido no interior da agulha; C: aplicação do microchip de modo subcutâneo entre as escápulas de um gambá (*Didelphis* spp.) capturado, após antissepsia com álcool 70%.



Figura 7. Leitura de microchip aplicado em mamífero capturado (leitor modelo AT01, Animal Tag®, Brasil).

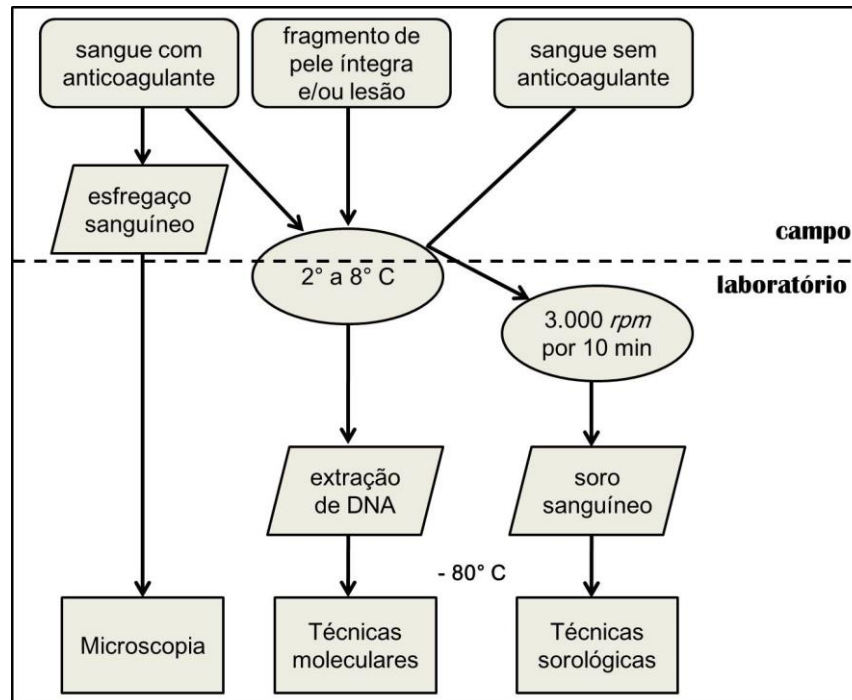


Figura 8. Fluxograma de processamento e armazenamento das amostras biológicas colhidas de mamíferos silvestres capturados na área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo.

Informações referentes a cada animal capturado foram registradas a campo em planilhas impressas, sendo posteriormente armazenadas em planilha eletrônica do Excel (v. 2010, Microsoft®). Os dados registrados foram: numeração, atribuída em sequência para identificação do animal; número do microchip aplicado; classificação taxonômica (238); sexo; condição biológica estimada (filhote, jovem, adulto); estado geral de saúde (com ou sem alterações aparentes e descrição das alterações); e coordenadas geográficas da área de captura, obtidas com auxílio de GPS (modelo nüvi 50LM, Garmin®, EUA).

Cada animal capturado foi fotografado para auxiliar na identificação da espécie, realizada com o auxílio de um guia de identificação de mamíferos brasileiros (242). Após essas etapas, realizou-se a soltura do animal no local de captura.

As amostras foram transportadas até o laboratório da UVZ em caixa térmica com gelo reciclável e termômetro para controle de temperatura. Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 3000 rpm/10 min para obtenção do soro, que foi armazenado a -80° C até a realização da sorologia. Tubos contendo sangue total e amostras de biópsia cutânea foram armazenados sob refrigeração (2 a 8° C) até o término de cada semana de captura, quando foram encaminhados, também sob refrigeração, ao IAL-SP para extração de DNA. As amostras extraídas foram armazenadas a -80° C até a realização das técnicas moleculares.

As lâminas de esfregaço sanguíneo confeccionadas a campo foram armazenadas à temperatura ambiente, sendo posteriormente coradas com o kit comercial Instat Prov[®] (Newprov, Brasil) e avaliadas sob microscopia óptica (Olympus BX40F-33) em objetiva de imersão (1000 x) para pesquisa de formas compatíveis com tripanossomatídeos.

4.5. Extração de DNA e avaliação da qualidade de amostras extraídas

A extração de DNA das amostras colhidas foi realizada com o uso do kit comercial *QIAamp DNA mini Kit* (Qiagen[®], Holanda) no extrator QIAcube (Qiagen[®], Holanda), de acordo com instruções do fabricante.

Após a extração, realizou-se quantificação da concentração de DNA (ng/μL) de cada uma das amostras no equipamento NanoDrop ND-1000[®] (Thermo Fisher Scientific, EUA). O grau de pureza foi determinado pela razão 260/280. A integridade do DNA e ausência de inibidores nas amostras extraídas foi avaliada por PCR com *primers* para o gene conservado da proteína de ligação do interfotorreceptor retinóide de mamíferos, que amplificam um produto de 227 pares de base (pb), IRBP-CF-FWD (5'-TCCAACACCACCACTGAGATCTGGAC-3') e IRBP-CF-REV (5'-GTGAGGAAGAAATCGGACTGGCC-3') (243).

Essas reações foram realizadas em duplicata em termociclador Veriti[®] 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems[®], Life Technologies, EUA), utilizando-se 1,0 μL da amostra extraída (10 ng/μL) e 11,0 μL de mix composto por: 1,3 μL de tampão (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4), 0,4 μL MgCl₂ (1,6 μM), 0,25 μL de cada oligonucleotídeo (2,0 μM), 0,25 μL dNTP (0,2 mM), 0,25 μL (1 U) de *Platinum[®] Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Brasil) e 8,3 μL de água ultrapura. Empregou-se o seguinte perfil de ciclagem: 95° C/5 min; 30 ciclos a 95°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/30 seg; e extensão final de 72°C/5 min.

4.6. Investigação da infecção por *Leishmania* spp.

4.6.1. Técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

As técnicas sorológicas para *Leishmania* spp. foram executadas em duplicata no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses (LDZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de

Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu-SP, utilizando-se dois testes sorológicos: o Kalazar DetectTM (KD, Inbios International[®], EUA) e o teste de aglutinação direta (DAT).

Foram utilizadas amostras de soros controles positivos e negativos de cães do município de Campinas, oriundos, respectivamente, de residências localizadas no interior e distantes do foco de LVC. Essas amostras haviam sido previamente testadas em laboratório de referência (IAL-SP), utilizando-se as técnicas oficiais de diagnóstico de LVC no Brasil, recomendadas pelo Ministério da Saúde (ELISA e TR-DPP[®] – Bio-Manguinhos, Brasil).

4.6.1.1. Kalazar-detectTM

O teste imunocromatográfico de fluxo lateral KD foi desenvolvido para detecção qualitativa de anticorpos para o antígeno rK39 do complexo *L. donovani* em humanos. É composto por uma fita de membrana de nitrocelulose pré-revestida com o antígeno rK39 na linha teste e com o anticorpo de galinha anti-proteína A conjugada ao ouro coloidal (conjugado corante) no controle (Fonte: bula do teste, Inbios International[®], EUA).

Se anticorpos contra o complexo *L. donovani* estiverem presentes na amostra de soro, estes reagem com a proteína A conjugada ao ouro coloidal e a solução tampão propicia a migração desse complexo até a área teste da fita. Nessa área, os anticorpos reagem com o antígeno rK39, revelando-se uma linha cuja coloração vermelha é atribuída ao ouro coloidal. Ainda que o teste seja negativo, há migração do complexo “proteína A-conjugado” para a região controle, onde é “capturado” pelos anticorpos de galinha anti-proteína A, produzindo uma linha vermelha que indica o funcionamento correto do teste. Não se procede à leitura caso esta linha não seja observada (Fig. 9. Fonte: bula do teste, Inbios International[®], EUA).

O KD foi executado de acordo com instruções do fabricante. Para tanto, 20,0 µL da amostra de soro à temperatura ambiente foram adicionados na tira teste, colocada com a extremidade voltada para baixo em uma microplaca. Foram adicionados 40,0 a 60,0 µL da solução tampão à cavidade da microplaca, aguardando-se 10 a 15 minutos para a leitura do resultado. Adicionalmente às amostras de soros controles de cães, foram utilizadas amostras de soro positivas e negativas de humanos, armazenados na soroteca do LDZ-UNESP.

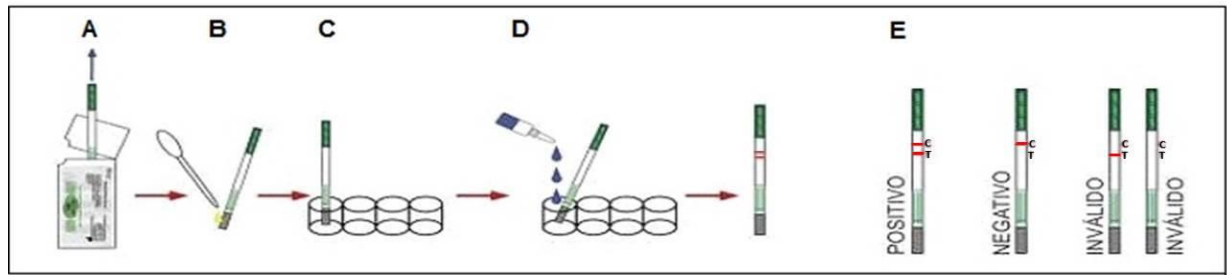


Figura 9. Etapas de realização do teste imunocromatográfico rápido Kalazar Detect™ (Inbios International®, EUA). A: abertura do envelope e retirada da fita de teste; B: adição da amostra; C: aplicação da fita em cavidade de microplaca; D: adição de solução tampão; E: leitura de resultados após 10 a 15 minutos, onde a linha superior “C” representa a área controle e a linha inferior “T” representa a área teste. Figura extraída da bula do teste.

4.6.1.2. Teste de aglutinação direta

O antígeno líquido utilizado no DAT foi produzido de acordo com protocolo descrito por Harith *et al.* (244), com algumas modificações. Foram utilizadas promastigotas de cepas padrão das espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *L. donovani*, *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) e *L. (L.) donovani* (MHOM/ET/1967/HU3), cultivadas até a fase estacionária de crescimento em meio de cultura bifásico, contendo os meios Novy-McNeal-Nicolle (NNN) e *Liver Infusion Tryptose* (LIT).

Cada cepa foi centrifugada separadamente, a 4.000 *G*/15 min, sob temperatura de 4° C, seguida de cinco centrifugações a 3200 *G*/10 min a 4° C, com lavagem do *pellet* por adição de 200 volumes iguais de solução de Locke (SL; NaCl 4,5g; KCl 0,21g; CaCl 0,12g; NaHCO₃ 0,1g; glicose 0,5g, água deionizada estéril 500 mL).

O *pellet* foi, então, incubado por 45 min a 37° C em SL contendo tripsina 0,4% (LGC® Biotecnologia, Brasil), repetindo-se cinco lavagens a 3.200 *G*, conforme descrito. O *pellet* foi ressuspendido, ajustando-se a concentração para 2x10⁸ promastigotas/mL. Adicionou-se igual volume de formaldeído 2,0% (peso/volume) em SL, realizando-se incubação a 4° C *overnight* (16 a 20 horas).

Após esta etapa de fixação, seguiram-se mais duas lavagens, conforme descrito, porém com o uso de solução fisiológica (SF) refrigerada. O *pellet* foi ressuspendido em uma concentração de 1x10⁸ promastigotas/mL em SF contendo 0,02% do corante *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma-Aldrich®, EUA), mantendo-se sob agitação moderada por 90 min. Por fim, repetiram-se duas lavagens com SF, com ajuste final da concentração para 1x10⁸

promastigotas/mL em SF contendo 1,0% de formaldeído. Os dois antígenos líquidos obtidos foram estocados separadamente a 4° C em frasco âmbar até sua utilização.

Para execução do teste foram utilizados soros controles positivos e negativos de cães de Campinas. Como controle do antígeno, utilizou-se apenas solução diluente contendo SF, 0,7% de 2-mercaptoetanol (2-ME) (VETEC, Brasil) e 1,0% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) inativado a 56° C por 30 min. Cada amostra de soro foi diluída em microplaca de fundo chato, de 1:20 até 1:40.960, em solução diluente. Foram transferidos 50,0 µL de cada diluição para microplacas em fundo V, que foram incubadas por uma hora a 37° C, para ação do 2-ME. Em seguida, foram adicionados 50,0 µL da suspensão de antígeno líquido (individualmente para cada amostra), com incubação *overnight* à temperatura ambiente (245).

A leitura dos resultados foi realizada após observação das reações esperadas nos controles, considerando-se positivas as reações em que não se observou formação de um botão completo de coloração azul no fundo da cavidade em V.

4.6.2. Técnicas moleculares para detecção do DNA de *Leishmania* spp.

As técnicas moleculares foram aplicadas às amostras extraídas de sangue total no IAL Centro de Laboratórios Regionais Bauru II, São Paulo (IAL-Bauru), e às amostras de pele (íntegra e/ou lesão) no IAL-SP. O Quadro 2 descreve as técnicas de PCR utilizadas, de acordo com a região-alvo e *primers* empregados, além da amostra biológica.

Quadro 2. Técnicas moleculares para detecção de *Leishmania* spp. em amostras de DNA extraído a partir de amostras biológicas dos mamíferos silvestres capturados na área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo.

Região-alvo	<i>Leishmania</i> spp.		kDNA de <i>Leishmania</i> (<i>L.</i>) <i>infantum</i>
	ITS1	HSP70	
<i>Primers</i>	LITSR/L5.8s	HSP70F/HSP70R	Lch14/Lch15
<i>Técnica</i>	cPCR*		qPCR**
<i>Amostra</i>	Sangue, pele íntegra e/ou lesão cutânea		sangue

Legenda: Reação em cadeia da polimerase: *convencional e **em tempo real.

4.6.2.1. PCR convencional (cPCR) para detecção de parasitas do gênero *Leishmania*

A cPCR para detecção de fragmentos do DNA de *Leishmania* spp. foi realizada em duplicata em termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Life

Technologies, EUA). Cada reação continha 1,0 µL do DNA extraído (amostras de sangue total, de pele íntegra e/ou pele de lesão, com no mínimo 10,0 ng/µL) e 11,0 µL de mix composto por: 1,3 µL de tampão (50 mM KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4), 0,4 µL MgCl₂ (1,6 µM), 0,25 µL de cada oligonucleotídeo (0,2 µM), 0,25 µL dNTP (0,2 mM), 0,25 µL (1 U) de *Platinum® Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Brasil), e 8,3 µL de água ultrapura.

Em cada ensaio foram incluídos 10,0 ng de DNA extraído de cultivo de cepa padrão de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) como controles positivos, além de água ultrapura como controle negativo.

Dois diferentes iniciadores foram utilizados para essas reações. Os *primers* LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') foram empregados para amplificação de um produto de 300 a 350 pb da região ribossomal do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) de *Leishmania* spp., situada entre a subunidade menor (SSU, *small subunit*) e 5.8S do rRNA (246). As condições de amplificação utilizadas foram descritas por El Tai *et al.* (246), com modificação: desnaturação inicial a 95° C/2 min; 35 ciclos a 95° C/20 seg, 53° C/30 seg e 72° C/1 min; e extensão final a 72° C/6 min.

Já os *primers* HSP70F (5'-AGGTGAAGGCGACGAACG-3') e HSP70R (5'-CGCTTGTCCATCTTTGCGTC-3') (247) amplificam um produto de 337 pb do gene codificador de proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*) HSP70 de *Leishmania* spp.. Para essas reações, empregou-se o seguinte perfil de ciclagem: 94° C/4 min; 40 ciclos a 94° C/30 seg, 61° C/30 seg, 72° C/30 seg; e extensão final a 70° C/10 min.

4.6.2.2. cPCR espécie-específica para detecção de *Leishmania (Leishmania) infantum*

As amostras sanguíneas e de fragmentos de pele íntegra e/ou de lesão foram submetidas em duplicata à cPCR com os *primers* Lch14 (5'-CGCACGTTATATCTACAGGTTGAG3') e Lch15 (5'-TGTTTGGGATTGAGGTAATAGTGA3'), que amplificam fragmento de 167 pb da região do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. (L.) infantum* (248).

Essas reações foram compostas pelos mesmos volumes e concentrações utilizados para a cPCR gênero-específica (item 4.6.2.1), empregando-se o seguinte perfil de ciclagem:

desnaturação inicial a 94° C/4 min; 35 ciclos a 94° C/30 seg, 61° C/30 seg e 72° C/30 seg; e extensão final de 70° C/10 min.

Foram utilizados 10,0 ng de DNA extraído de cultivo de cepa padrão de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) como controle positivo e de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) como controle negativo, além de água ultrapura.

4.6.2.3. qPCR para detecção de *Leishmania (Leishmania) infantum*

As amostras de sangue foram submetidas à PCR em tempo real (qPCR) para detecção de fragmento de DNA de *L. (L.) infantum*, a fim de verificar a detecção do parasita nesse material biológico em comparação à cPCR, além de quantificar a carga parasitária na amostra. Para isso, foram empregados os mesmos *primers* (Lch14 e Lch15) e controles descritos para a cPCR espécie-específica (item 4.6.2.2).

Cada reação foi realizada em triplicata, contendo 12,5 µL de *Power SYBR Green PRC Master Mix* (Applied Biosystems®, Life Technologies, EUA), 5,0 µM de cada *primer*, 8,5 µL de água ultrapura e 2,0 µL do DNA extraído (com no mínimo 10,0 ng/µL), totalizando 25,0 µL. Em cada ensaio foi incluída curva-padrão, composta por amostras de DNA extraído de cultivo de *L. (L.) infantum*, com concentrações ajustadas de 10⁰ a 10⁴ parasitas/µL.

As condições de ciclagem no equipamento *Step-One Plus* (Applied Biosystems Life Technologies®, EUA) foram: 95° C/10 min; 40 ciclos de 95° C/15 seg, 60° C/1 min; e uma etapa para a curva de dissociação de 95° C/15 seg, 60° C/1 min e 95° C/15 seg.

4.6.3. Técnicas moleculares para identificação de espécies de *Leishmania*

4.6.3.1. qPCR com análise de dissociação de alta resolução (HRM-qPCR)

A técnica de HRM-qPCR (*High resolution melting-qPCR*) foi utilizada em amostras em que foi detectado fragmento de DNA de *Leishmania* com o uso da cPCR, sem que fosse possível identificar, entretanto, a espécie do parasita pelo sequenciamento genético.

A técnica foi realizada no IAL-Bauru, de acordo com protocolo descrito por Hernández *et al.* (247). Foram empregados os mesmos *primers* para a região ITS1 e HSP70 descritos para a cPCR gênero-específica (item 4.6.2.1). Em cada reação utilizou-se um

volume final de 20,0 µL, sendo 10,0 µL do *Meltdoctor*TM *HRM Master-mix* (Applied Biosystems®, Life Technologies, EUA), 0,4 µL de cada oligonucleotídeo (0,2 µM), 6,2 µL de água ultrapura e 3,0 µL do DNA extraído com concentração ajustada de 10,0 ng/µL.

As condições utilizadas no equipamento *Step-One Plus* (Applied Biosystems Life Technologies®, EUA) para a qPCR foram: 95° C/10 min para ativação enzimática; 40 ciclos a 95° C/15 seg para desnaturação e 60° C/ 1 min para anelamento/extensão. Após essas etapas, realizou-se uma dissociação do *amplicon*, seguida por uma etapa de fusão (*melt curve*), com o seguinte perfil: desnaturação a 95° C/10 seg; anelamento a 60° C/1 min, dissociação de alta resolução a 95° C/15 seg e anelamento final a 60° C/15 seg. De acordo com instruções do fabricante do equipamento, utilizou-se uma taxa de rampa de 0,3%.

As amostras foram avaliadas em duplicata, sendo comparadas às cepas padrão de diferentes espécies de *Leishmania* spp., obtidas a partir de DNA extraído de cultivo (Quadro 3). Devido à manipulação das cepas para sua manutenção no laboratório e, a fim de garantir a correta diferenciação das espécies, realizou-se o sequenciamento genético de cada uma das cepas, previamente à sua utilização. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

Para fins de padronização, foram também incluídas amostras biológicas previamente detectadas com DNA de *L. (L.) infantum*: sangue de gambá naturalmente infectado; punção de linfonodo de dois cães da APA de Campinas com diagnóstico de LVC autóctone (sorologia, PCR, sequenciamento genético e investigação epidemiológica), material gentilmente cedido pela pesquisadora Vera Lucia Pereira Chioccola, do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos do Centro de Parasitologia e Micologia do IAL-SP.

Quadro 3. Cepas de *Leishmania* spp. utilizadas como controle na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real com análise de dissociação de alta resolução (*high resolution melting real-time PCR*).

Espécie de <i>Leishmania</i> spp.	Cepa de referência ^a
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH8
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>L. (L.) mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL21
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147
<i>L. (L.) infantum</i>	MHOM/BR/2002/LPC-RPV
<i>L. (V.) naiffi</i>	MDAS/BR/1979/M5533

Legenda: ^acepas de referência obtidas a partir da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) WDCM 731 e mantidas em cultivo *in vitro* no Instituto Adolfo Lutz regional de Bauru, São Paulo.

4.6.3.2. PCR com análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-PCR)

Bem como a técnica de HMR-qPCR, a RFLP-PCR (*Restriction fragment length polymorphism PCR*) foi utilizada em amostras em que fragmentos do DNA de *Leishmania* spp. foram detectados com o uso da cPCR, sem que fosse possível identificar, entretanto, a espécie do parasita pelo sequenciamento genético.

A RFLP-PCR foi realizada de acordo com protocolo descrito por Montalvo e colaboradores (249). Inicialmente realizou-se a amplificação de um produto de 1422 pb utilizando-se os *primers* HSP70sen (5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3') e HSP70ant (5'-CCGCCCATGCTCTGGTACATC-3') (250). As reações foram compostas por 25,0 µL de *DreamTaq Green PCR Master Mix 2X* (Thermo Fisher Scientific, USA), 4,1 µL (0,4 µM) de cada *primer*, 1,0 µL do DNA extraído com concentração mínima de 10,0 ng/µL, 0,1 µL de dimetilsulfóxido P.A. (VETEC, Sigma-Aldrich, Brasil) e 15,7 µL de água ultrapura.

Em cada ensaio foi incluso DNA extraído de cultivo *in vitro* de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) como controles positivos, além de água ultrapura e DNA extraído de cultivo *in vitro* de *Candida* spp. como controles negativos.

A cPCR foi executada em termociclador *Veriti*® 96 Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*®, Life Technologies, EUA), com as condições de ciclagem: 94° C/5 min; 33 ciclos a 94° C/30 s, 61° C/1 min e 72° C/3 min; e extensão final a 72° C/10 min. Os produtos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (descrita no item 4.9.), e purificados com o uso do kit *Illustra*® *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare, Reino Unido), segundo recomendações do fabricante.

A seguir, cada produto purificado foi submetido à digestão por endonucleases de restrição, em reações compostas por 5,0 µL do produto, 5,0 µL de *buffer* e as seguintes quantidades e concentrações das enzimas (adicionadas separadamente): 0,1 µL (1U) de *HaeIII* e *BccI*; 0,5 µL (5U) de *RsaI* (New England Biolabs® Inc., EUA). As reações foram incubadas *overnight* a 37° C e analisadas quanto ao tamanho dos fragmentos de restrição por eletroforese em gel de agarose a 3,0%, utilizando-se voltagem de ± 4 V/cm. Para o padrão de peso molecular, foi utilizado o *LowRanger 100 bp DNA Ladder* (Norgen, Canadá).

4.7. Investigação da infecção por *Trypanosoma cruzi*

A pesquisa do DNA de *T. cruzi* nas amostras de sangue por meio da técnica de cPCR foi realizada no IAL-Bauru, em termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Life Technologies, EUA), em duplicata. Para isso, foram utilizados os mesmos volumes e concentrações descritos para pesquisa de *Leishmania* (item 4.6.2.1).

Como controle positivo, foram utilizados 10,0 ng de DNA extraído de cultivo *in vitro* da cepa Y de *T. cruzi*; e de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) e *Candida* spp. como controles negativos, além de água ultrapura.

Os *primers* P35 (5'AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA3') e P36 (5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT3') foram empregados para amplificação de produto de 330 pb da região do minicírculo do kDNA de *T. cruzi* (251). As condições de ciclagem foram descritas por Vallejo *et al.* (252), com modificações: 96° C/2 min; 35 ciclos a 94° C/1 min, 60° C/1 min, 72° C/1 min; e 72° C/10 min.

Foram também utilizados *primers* para região do microsatélite do DNA nuclear (nDNA) de *T. cruzi*, TCZ1 (5'CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT3') e TCZ2 (5'CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG3'), que amplificam 188 pb (253). O perfil de ciclagem utilizado para essas reações foi descrito por Virreira *et al.* (254): 94° C/5 min; 35 ciclos 94° C/20 seg, 57° C/10 seg, 72° C/30 seg; e extensão final a 72° C/7 min.

4.8. Investigação da infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa brasileira

4.8.1. Investigação sorológica em amostras de gambás

A pesquisa de anticorpos para *R. rickettsii* foi realizada por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) no Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de São Paulo-SP. Apenas as amostras de soro sanguíneo de gambás foram testadas, considerando-se a necessidade e disponibilidade de reagentes espécie-específicos para execução desta técnica.

As lâminas previamente fixadas com antígeno de *R. rickettsii* cepa Taiaçu e mantidas sob refrigeração foram imersas em solução salina tamponada (SST) à temperatura

ambiente por 10 min. Após a secagem, foram transferidos para os poços das lâminas 10,0 µL das amostras de soro a serem testadas e de soros controles (positivo e negativo) de gambás, diluídos previamente a 1:64 (10 µL de soro e 630 µL de SST).

Em seguida, as lâminas foram incubadas à 37° C em câmara úmida por 30 minutos. Após esse período, foram submetidas a duas lavagens de dez minutos com SST e mantidas à temperatura ambiente para secagem. Após secas, a cada poço da lâmina foram adicionados 15,0 µL do conjugado total anti-gambá (produzido pelo CCZ de São Paulo-SP), diluído a 1:100 em solução de azul de Evans 4,0 mg%. As lâminas foram novamente incubadas, lavadas e secas conforme descrito, evitando-se à exposição à luz.

A leitura das lâminas montadas com glicerina tamponada e lamínula foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, em objetiva de 40 X. Foram consideradas positivas amostras em que se observou fluorescência de coloração verde das formas coco-bacilares das riquetsias, intra ou extracelulares, baseando-se na reação do controle positivo. Quando a fluorescência não foi observada, verificando-se apenas formas avermelhadas, a reação foi considerada negativa, também com base na reação controle.

As amostras positivas foram submetidas à titulação, em diluições seriadas e duplicadas (razão 2) de 1:64 a 1:2.048. O título de anticorpos foi definido como a diluição mais alta em que foi observada fluorescência nítida das riquetsias.

4.8.2. cPCR para *Rickettsia* spp. e para o grupo da febre maculosa brasileira

A cPCR para pesquisa do DNA de riquetsias foi realizada em duplicata, utilizando-se amostras sanguíneas de todos os mamíferos capturados. As reações foram executadas na Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de São Paulo-SP, em termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha). Os iniciadores utilizados estão descritos no Quadro 4.

Inicialmente realizou-se amplificação de fragmentos do gene *gltA*, que codifica a enzima citrato sintase de *Rickettsia* spp., com as seguintes condições de ciclagem: 95° C/3 min; 36 ciclos a 94° C/50 s, 55° C/45 s e 72° C/7 min; e extensão final a 72° C por 7 min para os *primers* CS-5/CS-6; e 95° C/15 min; 34 ciclos a 95° C/40 s, 54° C/ 40 s e 72° C/ 50 s; e extensão final a 72° C/ 10 min para os *primers* CS-239/CS-1069.

As amostras foram também submetidas à cPCR para amplificação de fragmento do gene *ompA*, específico da proteína da membrana externa de riquetsias do GFM, utilizando-se os *primers* Rr190.70p/Rr190.602n (257), com o seguinte perfil de ciclagem: 95° C/15 min; 34 ciclos a 95° C/40 s, 58° C/40 s, 72° C/40 s; e 72° C/10 min.

Quadro 4. Iniciadores (*primers*) utilizados para a reação em cadeia da polimerase convencional para pesquisa de DNA de *Rickettsia* spp. e de riquetsias do grupo da febre maculosa.

<i>Primers</i>	Região-alvo	Produto	Referência
CS-5: 5'GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT3' CS-6: 5'AGGGTCTTCGTGCATTTCTT3'	<i>gltA Rickettsia</i> spp.	147 pb*	Labruna <i>et al.</i> (255)
CS-239: 5'GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT3' CS-1069: 5'CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT-3'	<i>gltA Rickettsia</i> spp.	834 pb*	Labruna <i>et al.</i> (256)
Rr190.70p: 5'ATGGCGAATATTTCTCCAAA3' Rr190.602n: 5'AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT3'	<i>ompA</i> grupo da FMB	532 pb*	Regnery <i>et al.</i> (257)

Legenda: *pb, pares de base

Cada reação foi composta por um volume de 25,0 µL, sendo: 12,5 µL de *DreamTaq Green PCR Master Mix 2X* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 1,0 µL (10,0 µM) de cada *primer*, 2,0 µL do DNA extraído (concentração mínima de 10 ng/ µL) e 8,5 µL de água ultrapura. Em cada ensaio foi incluso DNA extraído de cultivo celular da cepa AT24 de *R. parkeri* como controle positivo e água ultrapura como controle negativo.

4.9. Visualização de produtos amplificados na cPCR

A identificação dos produtos amplificados nas reações de cPCR para todos os agentes pesquisados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para isso, foram acrescidos 2,0 µL de tampão de corrida (*BlueJuice® Gel Loading Buffer*, Invitrogen® Life Technologies®, EUA) a alíquotas de 8,0 µL dos produtos de cPCR, sendo submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1X (0,1 M Tris, 0,09 M de ácido bórico e 0,001 M de EDTA – Invitrogen, EUA).

Como corante intercalante foi utilizado 1,0 µL/10,0 mL de SYBR *safe* DNA gel stain (Invitrogen® Life Technologies®, EUA) nas reações para pesquisa de *Leishmania* e *T. cruzi* e do corante Unisafe Dye® (Uniscience, Brasil) na cPCR para pesquisa de riquetsias.

Os géis foram visualizados em transluminador Syngene® (Reino Unido) acoplado a uma câmera fotográfica. A verificação do tamanho dos fragmentos amplificados se deu por comparação visual com os controles positivos e com o padrão de peso molecular, determinado com o uso de 5,0 µL de *LowRanger 100 bp DNA Ladder* (Norgen, Canadá).

4.10. Sequenciamento genético de produtos de cPCR

Todos os produtos amplificados na cPCR para pesquisa de cada agente estudado foram purificados com o uso do kit comercial *Illustra® GFX PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare, Reino Unido), segundo recomendações do fabricante, sendo acrescidos a cada amostra purificada, separadamente, os *primers sense* e *antisense* utilizados.

Os produtos purificados foram encaminhados para sequenciamento genético pelo método de Sanger no Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu-SP, ou no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo-SP. As reações foram realizadas em sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®, Life Technologies, EUA), empregando-se o Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing 3.1* (Applied Biosystems®, Life Technologies, EUA) com precipitação por isopropanol/etanol, de acordo com o fabricante.

O eletroferograma das sequências *sense* e *antisense* obtidas foram visualizados no programa Chromas v. 2.3 (Technelysium Pty Ltd, Australia). As sequências foram submetidas ao alinhamento global no programa MEGA 5 (258) a fim de gerar uma sequência consenso. As sequências *sense*, *antisense* e consenso obtidas foram submetidas ao BLASTn (*nucleotide basic local alignment search tool*) e comparadas com as sequências depositadas no GenBank.

4.11. Análise dos dados

Os resultados de qPCR foram visualizados e analisados no programa *StepOne® Plus* v. 2.0 (Applied Biosystems®, Life Technologies, EUA). Os valores de fusão e as curvas

derivadas e normalizadas resultantes do HRM-qPCR foram visualizados e analisados no programa *High Resolution Melt* v. 3.0.1 (Applied Biosystems Life Technologies[®], EUA).

As prevalências foram calculadas de acordo com os resultados obtidos para cada espécie animal e técnica utilizada. Com base no nível de significância (α) de 5% adotado, foram calculados os respectivos intervalos de confiança de 95%. Os cálculos foram realizados no programa Stata versão 9.2 (Stata Corp., EUA). O programa *Google Earth Pro* v. 7.1.8.3036 foi utilizado para elaboração de imagens ilustrativas dos pontos de captura de animais positivos para cada agente pesquisado.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da amostra da fauna silvestre

O total de mamíferos amostrados na APA de Campinas entre abril de 2014 a março de 2015 foi de 82 animais, pertencentes a seis espécies. A Figura 10 ilustra o cenário observado em um dos condomínios da ATLV da APA.



Figura 10. Localização de residências em um dos dois condomínios da área de proteção ambiental municipal de Campinas, São Paulo, onde há um foco de transmissão de leishmaniose visceral canina desde o ano 2009. Observar a abundante área verde e a proximidade das residências aos fragmentos de vegetação.

A distribuição dos animais capturados de acordo com a espécie e nome comum, segundo o sexo e a condição biológica, está descrita na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta a distribuição de acordo com o local de captura: no interior ou fora da ATLV e da zona urbana da APA.

Seis animais (6/82; 7,32%; IC95% 1,68-12,95%), todos gambás da espécie *D. albiventris*, foram recapturados e amostrados em um segundo momento. A identificação desses animais foi realizada por meio da leitura do microchip aplicado por ocasião da primeira captura. A distribuição dos gambás recapturados está descrita na Tabela 3.

Não houve necessidade do uso de anestésicos na maioria dos animais. Apenas um *Callithrix penicillata* (sagui-do-tufo-preto) e um *D. albiventris* foram anestesiados. Um veado-catingueiro foi amostrado após ter sido atropelado no interior da área de estudo, na estrada de acesso a uma das áreas de armadilhamento. O animal foi socorrido pela UVZ-SMS-Campinas e a amostra foi colhida durante o atendimento.

Tabela 1. Distribuição das espécies de mamíferos silvestres capturadas na área de proteção ambiental municipal de Campinas, São Paulo (abril de 2014 a março de 2015), segundo o sexo e a condição biológica.

Espécie (nome comum)	Sexo		Condição Biológica				Total N (%)
	Macho	Fêmea	Não	Filhote	Jovem	Adulto	
	N (%)	N (%)	verificado N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<i>Callithrix jacchus</i> (sagui-do-tufo-branco)	5 (62,5)	3 (37,5)	0	0	2 (25,0)	6 (75,0)	8 (9,8)
<i>Callithrix penicillata</i> (sagui-do-tufo-preto)	10 (55,6)	8 (44,4)	0	0	2 (11,1)	16 (88,9)	18 (21,9)
<i>Didelphis albiventris</i> (gambá-de-orelha-branca)	19 (44,2)	24 (55,8)	0	9 (20,9)	9 (20,9)	25 (58,1)	43 (52,4)
<i>Didelphis aurita</i> (gambá-de-orelha-preta)	4 (36,4)	6 (54,5)	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (9,1)	9 (81,8)	11 (13,4)
<i>Mazama gouazoubira</i> (veado catingueiro)	1 (100,0)	0	0	0	1 (100,0)	0	1 (1,2)
<i>Sciurus (Guerlinguetus) aestuans</i> (esquilo)	0	1 (100,0)	0	0	0	1 (100,0)	1 (1,2)
Total (%)	39 (47,6)	42 (51,2)	1 (1,2)	10 (12,2)	15 (18,3)	57 (69,5)	82 (100,0)
IC95%*	36,7-58,4	40,4-62,0	-	5,1-19,3	9,9-26,7	59,5-79,5	-

Legenda: *Intervalo de Confiança de 95% (expresso em percentual).

Resultados

Tabela 2. Distribuição dos mamíferos silvestres amostrados na área de proteção ambiental municipal de Campinas, São Paulo (abril de 2014 a março de 2015), de acordo com a área de captura.

Espécie	Fora da zona urbana	Na zona urbana	Fora da ATLV ^a	Na ATLV ^a
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Callithrix jacchus</i>	8 (100,0)	0	8 (100,0)	0
<i>Callithrix penicillata</i>	5 (27,8)	13 (72,2)	5 (27,8)	13 (72,2)
<i>Didelphis albiventris</i>	14 (32,6)	29 (67,4)	18 (41,9)	25 (58,1)
<i>Didelphis aurita</i>	8 (72,7)	3 (27,3)	8 (72,7)	3 (27,3)
<i>Mazama gouazoubira</i>	1 (100,0)	0	1 (100,0)	0
<i>Sciurus (Guerlinguetus) aestuans</i>	0	1 (100,0)	0	1 (100,0)
Total (%)	36 (43,9)	46 (56,1)	40 (48,8)	42 (51,2)
IC95%*	33,2-54,7	45,3-66,8	37,9-59,6	40,4-62,0

Legenda: ^aATLV: área de transmissão de leishmaniose visceral, localizada em um raio de 1.000 m dos dois condomínios habitacionais de ocorrência dos casos caninos de leishmaniose visceral do município de Campinas, definida com base no raio de voo de *Lu. longipalpis*. *Intervalo de Confiança de 95% (expresso em percentual).

Tabela 3. Animais da espécie *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) capturados e amostrados em mais de uma oportunidade na área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo (abril de 2014 a março de 2015), identificados por leitura do microchip.

ID*	1ª captura		2ª captura	
	Local	Data	Local	Data
010	Gasoduto Bolívia-Brasil	21/05/2014	Gasoduto Bolívia-Brasil	04/06/2014
011	Condomínio A	22/05/2014	Condomínio A	16/09/2014
015	Gasoduto Bolívia-Brasil	05/06/2014	Condomínio A ¹	17/09/2014
037	Condomínio A	27/08/2014	Condomínio A	16/09/2014
045	Condomínio A	17/09/2014	Condomínio A	21/10/2014
062	Chácara divisa Campinas-Valinhos	27/11/2014	Chácara (mesma da 1ª captura)	28/01/2015

Legenda: *ID: identificação. ¹A distância aproximada entre os locais da 1ª e 2ª captura é de oito quilômetros.

Na avaliação clínica do estado de saúde geral, foram detectadas alterações em 15/82 (18,3%; IC95% 10,6-28,4%) mamíferos capturados (Tab. 4). Todos esses animais apresentaram lesões cutâneas, variáveis desde lesões hiperêmicas, crostosas, hipo ou hiperpigmentadas até lesões nodulares ou ulceradas. Apenas um *D. albiventris* apresentou sinais sistêmicos (apatia e prostração) associados à lesão de pele.

Uma amostra de pele das lesões foi colhida dos quinze animais. Não foi possível colher fragmento de pele íntegra de 16/82 mamíferos e de 1/6 *D. albiventris* recapturados,

devido à necessidade de maior tempo de contenção e manipulação dos animais para colheita de amostra satisfatória.

Tabela 4. Frequência e percentuais de alterações clínicas aparentes nos mamíferos silvestres capturados na área de proteção ambiental municipal de Campinas, São Paulo (abril de 2014 a março de 2015).

Espécie	Sem alterações	Com alterações	Total
	N (%)	N (%)	N (%)
<i>Callithrix jacchus</i>	8 (100,0 ^a / 11,9 ^b)	0	8 (9,8)
<i>Callithrix penicillata</i>	17 (94,4 / 25,4)	1 (5,6 / 6,7)	18 (21,9)
<i>Didelphis albiventris</i>	31 (72,1 / 46,3)	12 (27,9 / 80,0)	43 (52,4)
<i>Didelphis aurita</i>	9 (81,8 / 13,4)	2 (18,2 / 13,3)	11 (13,4)
<i>Mazama gouazoubira</i>	1 (100,0 / 1,5)	0	1 (1,2)
<i>Sciurus (Guerlinguetus) aestuans</i>	1 (100,0 / 1,5)	0	1 (1,2)
Total (%)	67 (81,7)	15 (18,3)	82 (100,0)
IC95%*	73,3-90,1	9,9-26,7	

Legenda: Percentual com relação: ^a ao total de animais da espécie; ^b ao total de mamíferos silvestres amostrados que apresentaram ou não alterações clínicas. *Intervalo de Confiança de 95% (expresso em percentual).

5.2. Pesquisa direta de tripanossomatídeos em esfregaços sanguíneos

À leitura das lâminas de esfregaços sanguíneos corados em microscopia não foi verificada a presença de formas compatíveis com os tripanossomatídeos investigados, *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*.

5.3. Qualidade do DNA extraído

As amostras de sangue e pele (íntegra e/ou lesão) apresentaram concentração de DNA superiores a 10 ng/μL e relação 260/280 entre 1,6 e 2,1. Nas reações de cPCR para gene endógeno, todas as amostras apresentaram bandas visíveis utilizando-se os *primers* IRBP, exceto aquelas colhidas de saguis (*Callithrix* spp.).

Para avaliação de amostras extraídas desses animais foi necessário utilizar os *primers* β1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3') e β2 (5'-CTTCTGACACAACTGTGTTCCTAGC-3'), que amplificam um fragmento de 140 pb do

gene da β -globulina (259). Nessas reações, observou-se que todas as amostras de saguis exibiram amplificação com produto de tamanho esperado.

5.4. Resultados da investigação de infecção por espécies de *Leishmania*

5.4.1. Técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*

Anticorpos foram detectados em dez animais (10/82; 12,2%; IC95% 5,1-19,3) por pelo menos uma das técnicas utilizadas. Com o uso do DAT, títulos inferiores a 80 foram detectados (Tab. 5; Fig. 11) em amostras de 9/82 mamíferos (10,9%; IC95% 4,2-17,7%). Apenas em amostras de três *C. penicillata* foram verificados títulos para ambos os antígenos utilizados. O único veado-catingueiro amostrado foi também o único animal positivo ao KD (Tab. 5; Fig. 12). Nenhum dos dez animais apresentou qualquer alteração clínica aparente.

Tabela 5. Detecção de anticorpos em amostras de soro de mamíferos silvestres capturados na área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo (abril de 2014 a março de 2015), de acordo com o teste sorológico utilizado.

Identificação do animal	Espécie	Títulos de anticorpos ao DAT*		Kalazar-Detect™
		<i>L. (L.) infantum</i> ^a	<i>L. (L.) donovani</i> ^b	
021 ^c	<i>Didelphis albiventris</i>	negativo	20	negativo
029 ^d	<i>Mazama gouazoubira</i>	negativo	negativo	positivo
039 ^c	<i>Callithrix penicillata</i>	20	negativo	negativo
042 ^e	<i>Sciurus (Guerlinguetus) aestuans</i>	40	negativo	negativo
054 ^e	<i>Callithrix penicillata</i>	20	negativo	negativo
073 ^d	<i>Callithrix jacchus</i>	negativo	20	negativo
074 ^c	<i>Callithrix penicillata</i>	20	20	negativo
080 ^e	<i>Callithrix penicillata</i>	20	40	negativo
081 ^c	<i>Callithrix jacchus</i>	20	negativo	negativo
087 ^e	<i>Callithrix penicillata</i>	40	40	negativo

Legenda: *Teste de aglutinação direta realizado com antígeno líquido produzido com promastigotas de

^a*Leishmania (Leishmania) infantum* e ^b*L. (L.) donovani*. Os animais foram capturados: ^cfora da área de transmissão de leishmaniose visceral (ATLV) e fora de perímetro urbano; ^dem áreas rurais próximas à ATLV;

^ena ATLV (perímetro urbano).

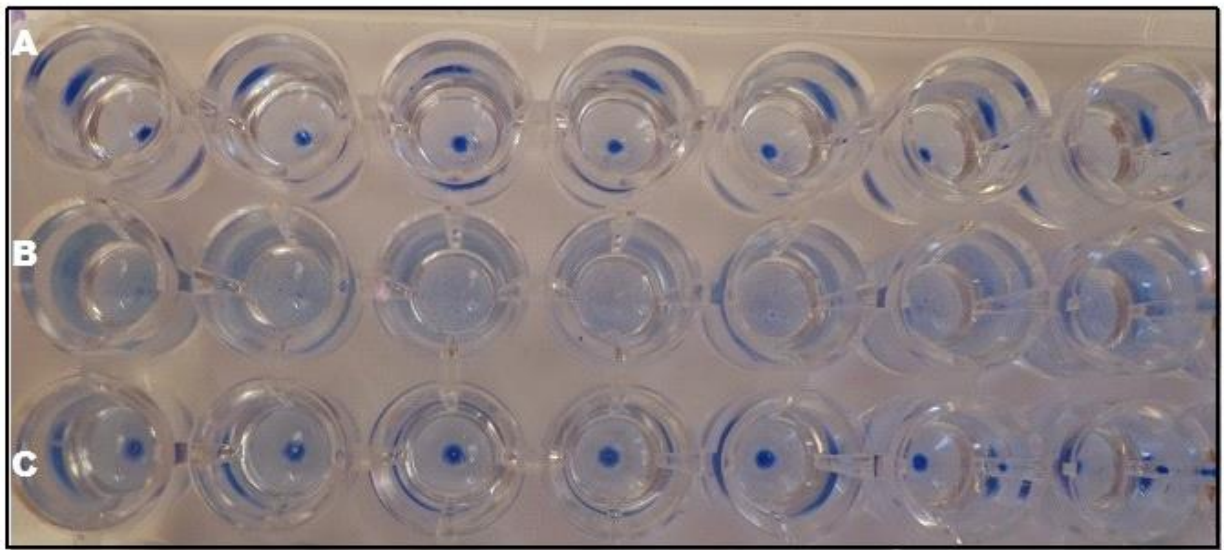


Figura 11. Teste de Aglutinação Direta (DAT). Reações dos controles com antígeno líquido de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. Linha A: controle do antígeno (solução diluente e antígeno); Linhas B e C: antígeno e soros controles positivo (B) e negativo (C) de cães de Campinas, SP. Notar em A e C a formação de botão completo na cor azul no fundo em V das cavidades da placa, indicando a ausência de detecção de anticorpos.

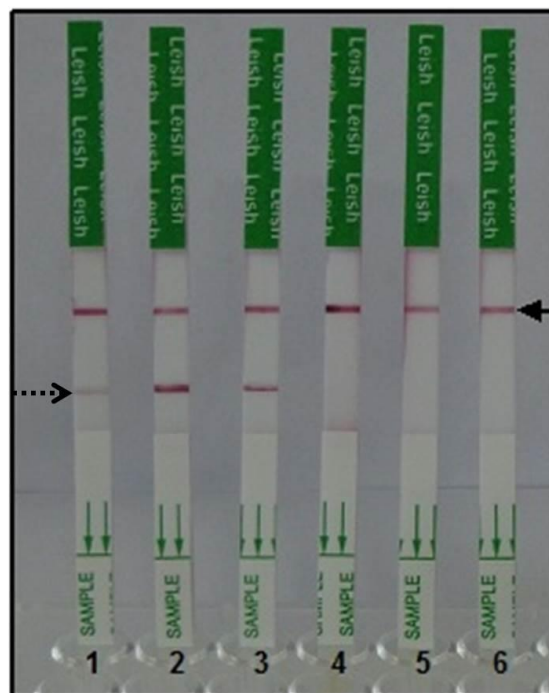


Figura 12. Teste imunocromatográfico rápido Kalazar-Detect™ (Inbios International®, EUA). As amostras ilustradas são: (1) soro de um *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro) amostrado na área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo; (2 e 3) soros controles positivos e (4, 5 e 6) negativos de cães de Campinas. Observar a linha vermelha na área controle (seta contínua) e na área teste (seta pontilhada) de amostras positivas.

5.4.2. Técnicas moleculares para detecção do DNA de *Leishmania* (cPCR e qPCR)

No total, 24/82 (29,3%; IC95% 19,4-39,1) mamíferos apresentaram amplificações de fragmento de DNA à cPCR para pesquisa de *Leishmania* (Tab. 6). Dois deles (#027, #031) exibiram manchas hipocrômicas na pele da cauda e um apresentou lesão cutânea (#040), mas não houve amplificação do material extraído das lesões.

A confirmação da identidade de *Leishmania* por sequenciamento genético ocorreu em produtos obtidos em amostras de 5/82 (6,1%; IC95% 0,9-11,3) mamíferos (Tab. 7). Dentre os cinco animais, um pertencia à espécie *C. penicillata* e os outros quatro eram gambás, três da espécie *D. albiventris* e um *D. aurita*. Com exceção de um *D. albiventris*, a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção dos outros quatro mamíferos (4/82; 4,9%; IC95% 2,1-9,5) foi definida por como *L. (L.) infantum*, agente da LV. A sequência obtida para o produto amplificado na amostra sanguínea do *D. albiventris* #086 obteve 99% a 100% de identidade com várias espécies de *Leishmania* subgênero *Viannia*.

Na ITS1-cPCR verificou-se que o fragmento de DNA de 500 pb amplificado na amostra de um *D. albiventris* (#040) foi identificado como *Trypanosoma rangeli* (sequência de 388 pb; 98% de identidade; *query cover* 100%; *E value* 0,0; acesso AY230237.1, depositada no GenBank com acesso KY421667). As sequências de outras oito amostras sanguíneas com produtos de 800 pb na ITS1-cPCR exibiram baixa cobertura e identidade com sequências de *Leishmania* e *Trypanosoma*.

De modo semelhante, não foi possível confirmar a identidade de *amplicons* obtidos de 20 amostras sanguíneas na cPCR com *primers* HSP70, incluindo 11/13 amostras amplificadas na ITS1-cPCR. Embora apresentassem tamanho esperado de 337 pb, os produtos exibiram sequências com baixa identidade (83% a 90%) com diversas espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania*, com elevada cobertura de sequência, de 99 a 100%.

Os *primers* específicos para *L. (L.) infantum*, Lch14 e Lch15, permitiram a detecção do parasita em amostras de pele e sangue de um *D. aurita* e na amostra de pele de um *D. albiventris*. Não foi realizado o sequenciamento do produto amplificado na amostra sanguínea #079, tendo em vista que o DNA de *L. (L.) infantum* já havia sido detectado pela ITS1-cPCR. Com o uso dos *primers* espécie-específicos na qPCR não se obteve quantificação do DNA do parasita ($> 1,0$ parasita/ μ L) para nenhuma amostra sanguínea.

Tabela 6. Mamíferos capturados na área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo (abril de 2014 a maio de 2015) cujas amostras apresentaram amplificação de fragmento de DNA à reação em cadeia da polimerase convencional, de acordo com o tamanho do fragmento (em pares de base) obtido para cada iniciador e amostra biológica. Em negrito: produtos com identidade confirmada como *Leishmania* por sequenciamento genético.

Identificação do animal	Espécie	ITS1 ^a		HSP70 ^b		Lch ^c	
		sangue	pele	sangue	pele	sangue	pele
002	<i>Didelphis aurita</i>	neg*	neg	neg	neg	167	167
004	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	neg	neg	neg	167
007	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
012	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
015	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
016	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
019	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
024	<i>Callithrix jacchus</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
025	<i>Callithrix jacchus</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
026	<i>Callithrix jacchus</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
027	<i>Didelphis aurita</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
031	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
032	<i>Callithrix penicillata</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
040	<i>Didelphis albiventris</i>	500	neg	neg	neg	neg	neg
043	<i>Callithrix penicillata</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
051	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
060	<i>Didelphis albiventris</i>	neg	neg	337	neg	neg	neg
067	<i>Didelphis albiventris</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
070	<i>Didelphis aurita</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
072	<i>Didelphis albiventris</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
076	<i>Didelphis albiventris</i>	800	neg	337	neg	neg	neg
079	<i>Didelphis albiventris</i>	320	800	337	neg	167	neg
086	<i>Didelphis albiventris</i>	320	neg	337	neg	neg	neg
087	<i>Callithrix penicillata</i>	neg	320	neg	neg	neg	neg

Legenda: A reação em cadeia da polimerase foi realizada com *primers* para a região: ^a do espaçador interno transcrito (ITS1) de *Leishmania* spp.; ^b do gene codificador de proteínas do choque térmico (HSP70) de *Leishmania* spp.; e ^c do minicírculo do kDNA de *Leishmania (Leishmania) infantum*. *neg: negativo.

Tabela 7. Amostras de mamíferos silvestres que exibiram amplificações de fragmentos de DNA na reação em cadeia da polimerase convencional, cuja identidade dos produtos foi confirmada como *Leishmania* por sequenciamento genético pelo método de Sanger.

Animal		Amostra biológica	Primers	Alvo	Pb ¹	BLASTn ²	GenBank ³
ID	Espécie						
002	<i>Didelphis aurita</i>	sangue	Lch14 Lch15	kDNA <i>L. (L.) infantum</i>	105	100% de identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 99%; E value 8e-46; acesso AF308682.1	MG765430
002	<i>Didelphis aurita</i>	pele	Lch14 Lch15	kDNA <i>L. (L.) infantum</i>	112	100% identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 100%; E value 2e-52; acesso AF308682.1 e outros	MF688837
004	<i>Didelphis albiventris</i>	pele	Lch14 Lch15	kDNA <i>L. (L.) infantum</i>	111	100% identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 100%; E value 4e-49; acesso AF308682.1 e outros	MF688838
079	<i>Didelphis albiventris</i>	sangue	LITSR L5.8S	ITS1 <i>Leishmania</i> spp.	266	100% identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 100%; E value 2e-135; acesso KR081265.1 e outros	KX580706
086	<i>Didelphis albiventris</i>	sangue	LITSR L5.8S	ITS1 <i>Leishmania</i> spp.	202	100% identidade <i>L. (V.) guyanensis</i> ; query cover 100%; E value 5e-100; acesso FJ753388.1 e outros 99% identidade com outras espécies do subgênero <i>Viannia</i> *	KX580707
087	<i>Callithrix penicillata</i>	pele	LITSR L5.8S	ITS1 <i>Leishmania</i> spp.	315	100% identidade <i>L. (L.) infantum</i> ; query cover 100%; E value 2e-162; acesso KY658231.1	MF688836

Legenda: ¹ Tamanho da sequência obtida, em pares de base. ² Resultado obtido com o BLASTn (*nucleotide basic local alignment search tool*). ³ Número de acesso sob o qual a sequência obtida foi depositada na base de dados do GenBank. *A amostra 086 exibiu 99% de identidade ao BLASTn com as seguintes espécies de *Leishmania*: *L. (V.) peruviana* (query cover 100%; E value 2e-98; acesso HG512896.1 e outros), *L. (V.) braziliensis* (query cover 100%; E value 2e-98, acesso FJ753382.1 e outros) e *L. (V.) panamensis* (query cover 100%; E value 3e-97; acesso CP009396.1 e outros).

5.4.3. Técnicas moleculares para diferenciação de espécies de *Leishmania* (HRM-qPCR e RFLP-PCR)

A técnica de HRM-qPCR foi utilizada para identificar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção do gambá-de-orelha-branca #086, cuja sequência obtida com a ITS1-cPCR exibiu identidade com várias espécies de *Leishmania* subgênero *Viannia*. A Figura 13 ilustra as possíveis diferenciações de espécies de *Leishmania* com os iniciadores utilizados.

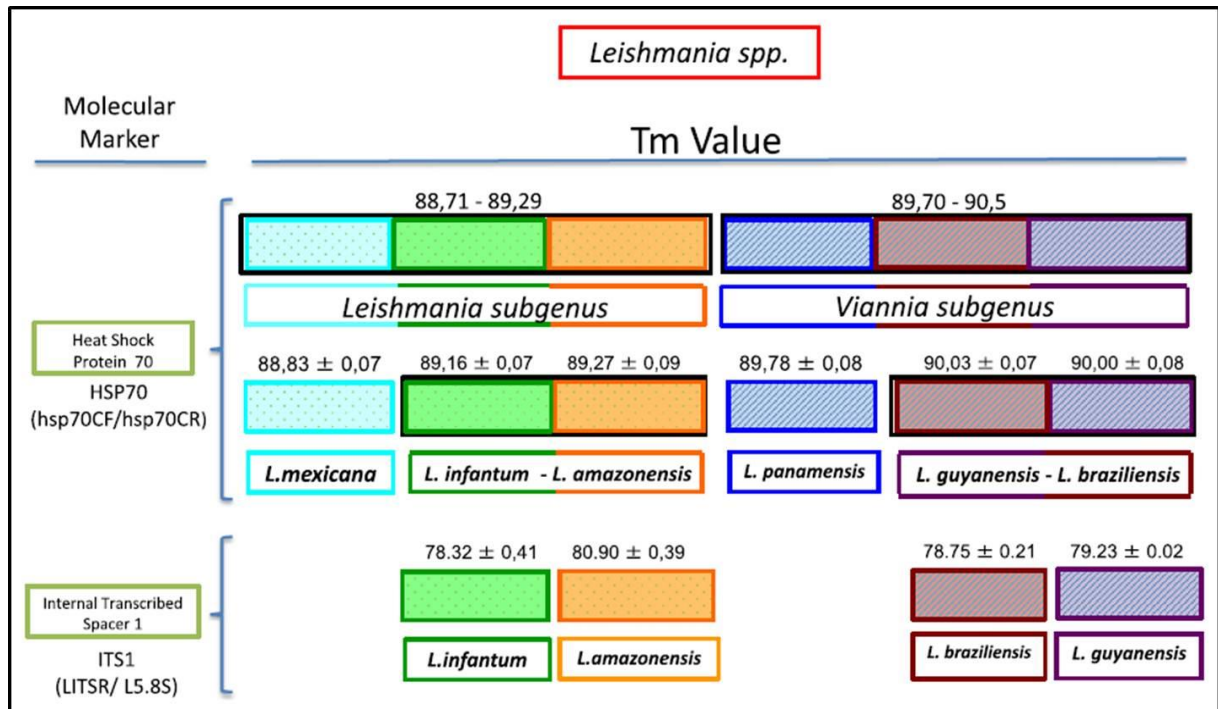


Figura 13. Diferenciação de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo com o uso da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real para os genes HSP70 e ITS1, seguida de análise de dissociação de alta resolução (HRM-qPCR). Extraída de: Hernández *et al.* (247).

Empregando-se como alvo a região ITS1, não foi possível obter picos de curvas de dissociação e, portanto, tampouco de valores de temperatura de *melting* (Tm). Esse resultado se repetiu mesmo com ajustes na concentração dos reagentes.

Já com o uso de *primers* para o gene HSP70 (Fig. 14), foi possível obter curvas adequadas e valores de Tm para as cepas padrão de *Leishmania* e para as amostras clínicas de dois cães de Campinas diagnosticados com LVC. Contudo, para as duas amostras sanguíneas de gambás – uma contendo DNA de *L. (L.) infantum* (#079) e a amostra objeto da análise para definição da espécie do subgênero *Viannia* (#086) – foram obtidas curvas de dissociação sem um pico satisfatório e valores de Tm muito abaixo daqueles verificados para as cepas padrão.

A técnica de RFLP-PCR também foi aplicada para identificação da espécie de *L. Viannia* detectada na amostra sanguínea do gambá #086. Os resultados estão ilustrados na Figura 15. Foi possível visualizar um padrão de tamanhos de fragmentos idênticos àqueles do protocolo utilizado para as cepas padrão, exceto para *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* com o uso da endonuclease *RsaI*, bem como para *L. (L.) donovani* com *HaeIII*. Não foi possível, contudo, obter um padrão de fragmentos compatível para diferenciação da espécie de *Leishmania* na amostra #086 em nenhuma das digestões enzimáticas.

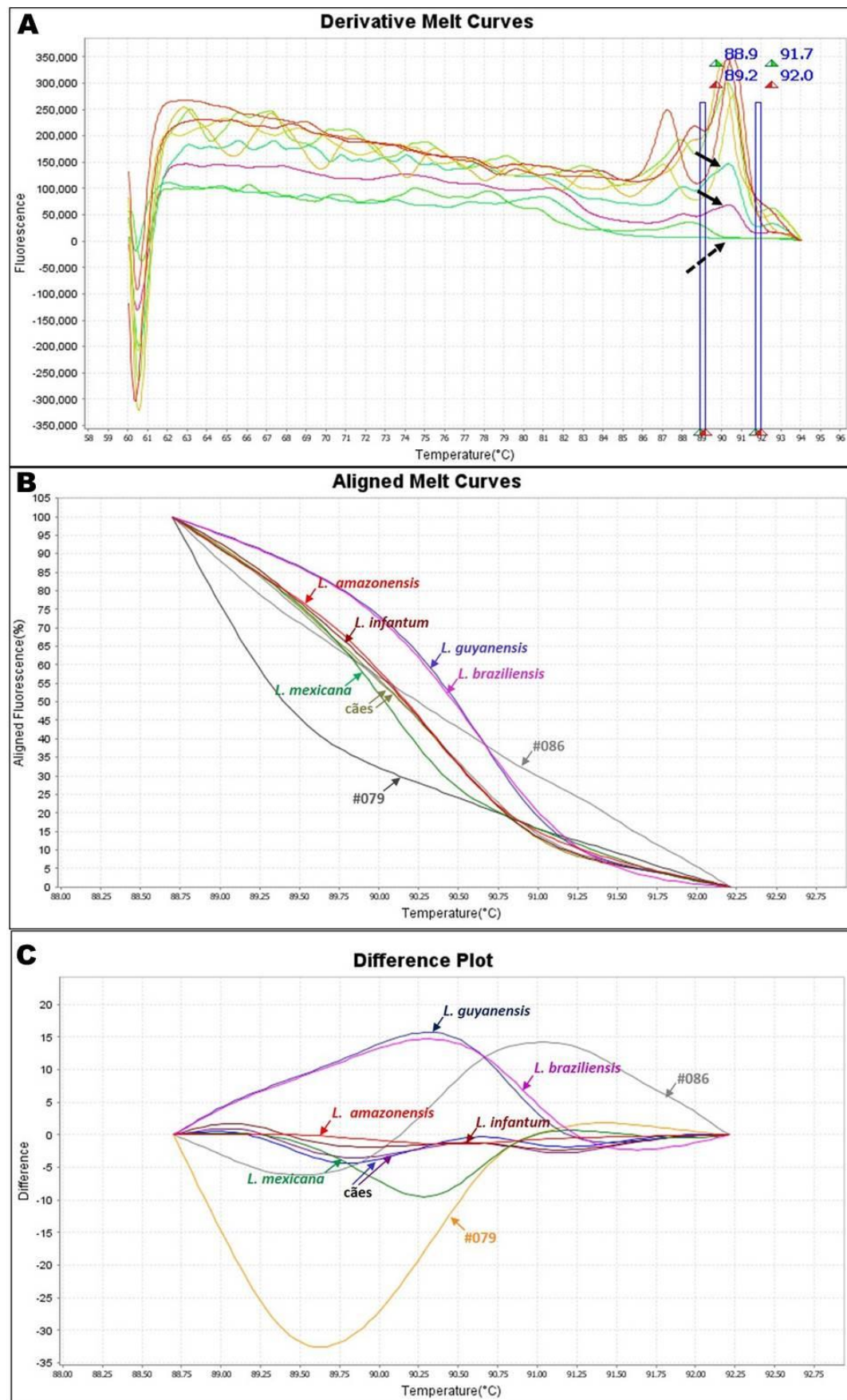


Figura 14. Resultados de reação em cadeia da polimerase em tempo real seguida de análise de dissociação de alta resolução (HRM-qPCR) com *primers* para o gene HSP70, analisadas no programa “High Resolution Melt

Resultados

Software” v. 3.0.1 (Applied Biosystems Life Technologies®, EUA). (A): Curvas de dissociação derivadas. Setas contínuas: amostras de linfonodo de cães da área de proteção ambiental (APA) de Campinas, São Paulo, diagnosticados com leishmaniose visceral. Seta pontilhada: duas amostras de *Didelphis albiventris* capturados na APA (#079 e #086). Observar a ausência de pico de dissociação. (B): Curvas de dissociação alinhadas. (C): Gráfico das diferenças entre curvas. Observar em B e C as curvas que se alinham: (i) *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*; (ii) *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e amostras de linfonodo de dois cães diagnosticados com leishmaniose visceral. As amostras dos dois *D. albiventris* (#079 e #086) não se alinham às demais curvas.

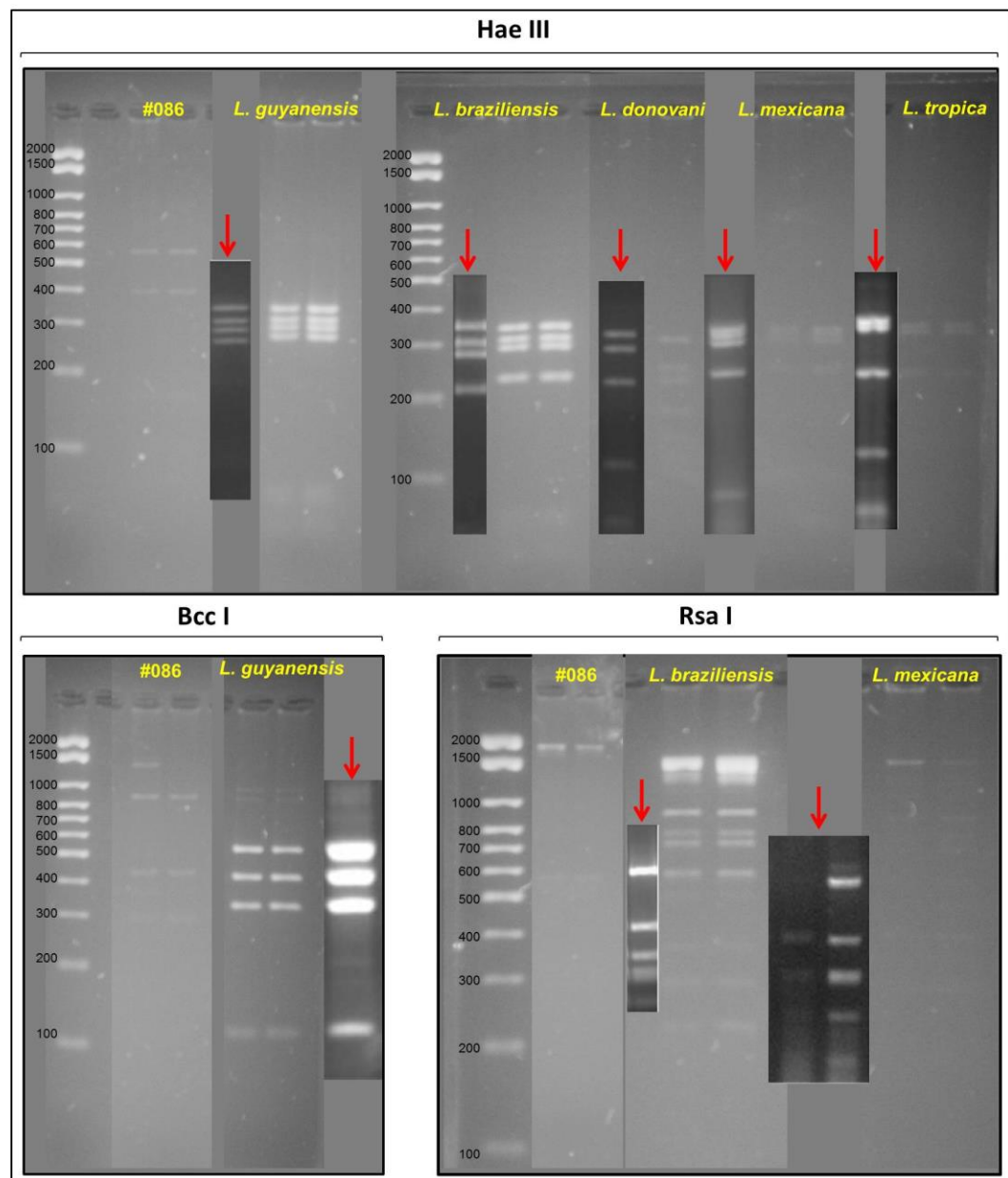


Figura 15. Resultados da técnica de reação em cadeia da polimerase com análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-PCR), utilizando *primers* para o gene HSP70 a fim de diferenciar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção de um *Didelphis albiventris* (#086). Setas vermelhas: imagens dos padrões obtidos com o protocolo, retiradas de Montalvo *et al.* (249), para fins de comparação.

5.4.4. Distribuição geográfica dos animais detectados com infecção por *Leishmania*

Os locais de captura dos animais detectados com infecção por *Leishmania* spp. estão ilustrados na Figura 16. Três dos cinco animais infectados foram capturados no interior do condomínio A, área contígua ao condomínio B que constitui a área de transmissão de LVC em Campinas. Outros dois animais foram capturados em um loteamento de chácaras.

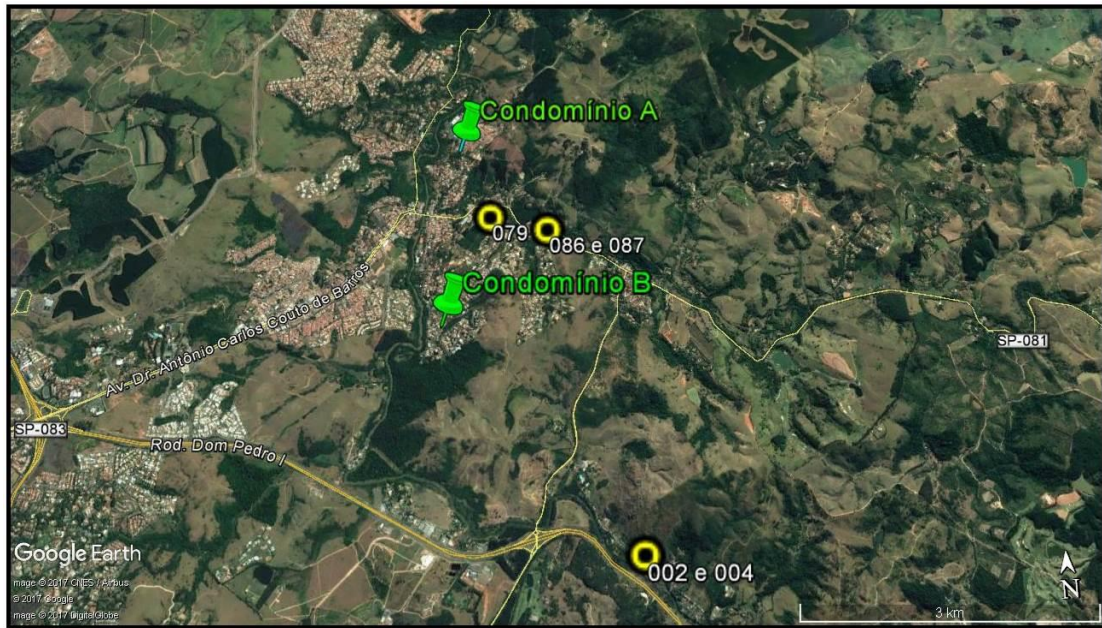


Figura 16. Área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo. Localização dos dois condomínios onde há o foco de transmissão de leishmaniose visceral e dos pontos de captura dos animais silvestres infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (#002, #004, #079 e #087) e *Leishmania* subgênero *Viannia* (#086).

5.5. Resultados da investigação de infecção por *Trypanosoma cruzi*

O DNA de *T. cruzi* foi detectado em amostras sanguíneas de três (3/82; 3,7%; IC95% 0,8-10,3) mamíferos capturados, todos da espécie *D. albiventris* (Tab. 8). Um dos gambás (#015) foi detectado com o parasita em dois momentos: por ocasião da primeira e da segunda captura. Os três gambás não apresentaram alterações clínicas aparentes no momento da captura, exceto o #031, que apresentou manchas hipocrômicas na cauda.

Outras quatro amostras (#024, #025, #026 e #043) exibiram produto de tamanho esperado (330 pb) utilizando os *primers* P35/P36, mas o sequenciamento genético não confirmou a identidade de *T. cruzi*. Adicionalmente, houve amplificação de 500 pb em duas amostras (#010R e #079), cuja identidade também não foi confirmada por sequenciamento.

A Figura 17 ilustra os locais de captura dos três *D. albiventris* detectados com DNA de *T. cruzi*. Todos foram capturados no interior do condomínio A, onde ocorrem os casos de LVC. Apenas o animal #015 foi capturado fora dessa área, por ocasião da primeira amostragem, que ocorreu em uma área de mata fragmentada pela passagem de gasodutos do sistema Bolívia-Brasil, localizada a aproximadamente oito quilômetros do condomínio A.

Tabela 8. Resultados de reação em cadeia da polimerase convencional e sequenciamento genético de amostras sanguíneas de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca) utilizando-se *primers* para duas regiões-alvo distintas do genoma de *Trypanosoma cruzi*.

Identificação do animal	Primers	Produto ²	BLASTn ¹				Acesso	GenBank ⁴
			Tamanho da seq ³	Identidade <i>T. cruzi</i>	Query cover	E Value		
015	ambos	188 / 330	296	97%*	49%*	3e-64*	AY520074.1	KY421668
015 recaptura	P35/P36	330	238	97%	11%	3e-05	HG008702.1	KY421670
031	P35/P36	330	277	99%	100%	4e-112	AB434508.1	KY421671
048	ambos	188 / 330	140	98%*	100%*	3e-60*	AY520031.1	KY421669

Legenda: ¹Nucleotide basic local alignment search tool. ²Tamanho do fragmento obtido e ³tamanho da sequência obtida, em pares de base. ⁴ Número de acesso sob o qual a sequência obtida foi depositada na base de dados do GenBank. * Resultados do sequenciamento do produto amplificado com os *primers* TCZ1/TCZ2.

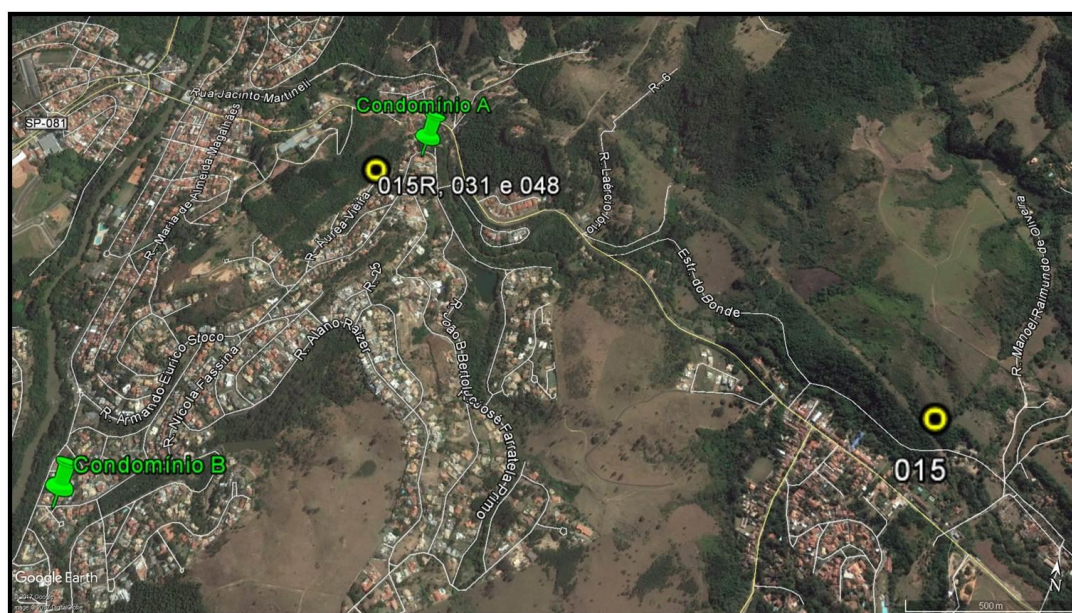


Figura 17. Área de proteção ambiental de Campinas, São Paulo. Pontos de captura dos gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) infectados com *Trypanosoma cruzi*. A identificação “015R” refere-se ao local de recaptura do animal 015. Os dois condomínios constituem a área de transmissão de leishmaniose visceral canina.

5.6. Resultados da investigação de infecção por riquetsias do grupo da FMB

5.6.1. RIFI para detecção de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*

Dentre as 60 amostras de soro de gambás submetidas à RIFI (54 gambás distintos e seis amostras colhidas por ocasião da recaptura), somente para a amostra de um *D. albiventris* (#053) foi detectado título de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* de 128, resultando em soroprevalência de 1,8% (1/54; IC95% 0,04-9,8) dentre os gambás testados e de 2,3% (1/43; IC95% 0,6-12,3) entre animais da espécie *D. albiventris*. O gambá positivo foi capturado em uma chácara na zona rural da APA, que está situada no mesmo loteamento (ilustrado na Fig. 16) em que os animais #002 e #004 foram capturados.

5.6.2. cPCR para *Rickettsia* spp. e riquetsias do grupo da FMB

Não foram observadas amplificações em amostras sanguíneas dos mamíferos capturados nas reações de cPCR utilizando dois diferentes *primers* para o gene *gltA* de *Rickettsia* spp. e para o gene *ompA* de riquetsias do grupo da FMB.

6. DISCUSSÃO

Apesar da escassez de conhecimento e da relativa negligência sobre os agentes que infectam animais da fauna silvestre, nos últimos anos foram obtidos avanços importantes. Novas técnicas de detecção, identificação e caracterização de parasitas foram desenvolvidas, permitindo a análise de amostras biológicas não invasivas em animais vivos ao invés de eutanasiados. Pode-se citar em especial o desenvolvimento de técnicas moleculares, cuja aplicação para pesquisa de infecções em mamíferos silvestres tem sido cada vez mais frequente, apresentando, em geral, elevada sensibilidade e especificidade (234,260–262).

Neste trabalho, a técnica de PCR convencional associada ao sequenciamento genético foi útil para identificar animais da fauna silvestre da APA de Campinas infectados por duas diferentes espécies de *Leishmania* e por *T. cruzi*, achados inéditos nessa região.

Verificou-se que todos os animais infectados com tripanossomatídeos foram capturados nas proximidades de áreas de habitações humanas na APA. Além disso, embora a composição da amostra da fauna silvestre tenha sido homogênea no que diz respeito à captura no interior e fora da ATLV, os cinco animais infectados com *Leishmania* e os três *D. albiventris* detectados com *T. cruzi* encontravam-se, no momento da captura, no interior ou próximos ao condomínio onde ocorrem os casos de LVC. Essas áreas não necessariamente representam o local de infecção desses animais, mas indicam a proximidade do homem e animais domésticos a animais da fauna silvestre infectados com agentes de zoonoses de importância à saúde pública.

A maioria dos mamíferos (06/10) detectados com anticorpos anti-*Leishmania* também foi capturada no interior ou nas proximidades da ATLV, embora somente títulos baixos de anticorpos tenham sido detectados em amostras de nove animais ao DAT e uma única amostra tenha sido positiva ao KD.

O teste KD utiliza o antígeno recombinante rK39 de *Leishmania* do complexo *L. donovani*, o qual atribui maior sensibilidade e especificidade à sorologia (53,263). Neste estudo, a técnica foi utilizada em substituição ao TR-DPP®, teste sorológico produzido com antígeno recombinante rK26/rK39 e indicado pelo Ministério da Saúde para triagem de casos caninos de LV no Brasil, tendo em vista seu fornecimento restrito para atividades de vigilância epidemiológica.

O único animal positivo ao KD foi também o único veado-catingueiro (*M. gouazoubira*) examinado. Embora outros estudos tenham empregado o KD em amostras de mamíferos silvestres (264–267), não foram encontrados, em literatura, relatos de seu uso em amostras dessa espécie animal.

Sabe-se que as imunoglobulinas produzidas por diferentes espécies animais exibem perfis distintos de ligação à proteína A empregada no KD: a IgG produzida por cães e gatos possui maior afinidade em relação a de bovinos e caprinos, que, por sua vez, possui afinidade superior àquela produzida por equinos (268). A afinidade à proteína A para a diversidade de espécies silvestres, entretanto, não é conhecida. Assim, são necessários maiores estudos para esclarecer a aplicabilidade do KD a amostras de diferentes espécies.

Por outro lado, o DAT tem sido considerado um teste sorológico de referência em estudos epidemiológicos (269). A técnica foi validada para uso em humanos e animais, demonstrando elevada concordância com outras técnicas sorológicas, como RIFI e ELISA (270,271), além de elevados valores de sensibilidade e especificidade (269,272–277). Seu uso, entretanto, é particularmente importante em estudos envolvendo diferentes espécies animais, por não necessitar de anti-imunoglobulinas espécie-específicas (conjugado), o que é uma limitação para o uso de outras técnicas.

A detecção de títulos elevados ao DAT permite a confirmação do diagnóstico, enquanto títulos baixos e menos específicos acarretam em prejuízos à especificidade. Nesses casos, o resultado é indicado para fins de triagem (278). Contudo, não há um ponto de corte padronizado para o uso do DAT na ampla variedade de espécies silvestres existente. A diluição de 1:320 foi padronizada para o uso do teste em amostras de canídeos (279), sendo posteriormente utilizada em diversos estudos envolvendo esses animais (93,270–272,280,281). Considerando o título de 320 como ponto de corte, os animais examinados neste estudo foram negativos, tendo em vista que apenas títulos de 20 e 40 foram detectados.

Entretanto, valores de ponto de corte inferiores de 1:10 (282) e 1:40 (283) foram utilizados em estudos epidemiológicos envolvendo gambás e canídeos no Brasil. É importante observar que um sagui exibiu título de 40 com ambos os antígenos utilizados no DAT e a infecção desse animal por *L. (L.) infantum* foi confirmada pela detecção do DNA do parasita por PCR.

Portanto, não é possível descartar a possibilidade de que os dez mamíferos detectados com anticorpos em pelo menos uma das duas técnicas tenham sido expostos à

infecção por *Leishmania*. Também não deve ser descartada a hipótese de que os títulos baixos e menos específicos detectados ao DAT tenham ocorrido por reação sorológica cruzada com outros parasitas, em especial com outros tripanossomatídeos.

Os resultados sugerem que a análise de títulos de anticorpos obtidos com o DAT independentemente de um ponto de corte pode ser útil em estudos epidemiológicos envolvendo diferentes espécies silvestres, desde que sejam consideradas as limitações de títulos baixos. É evidente, entretanto, a necessidade de estudos com esforços para a padronização de pontos de corte para o uso do DAT na diversidade de espécies silvestres.

É importante ressaltar que testes sorológicos e moleculares se baseiam em princípios distintos e seus resultados não são obrigatoriamente comparáveis. A PCR pode ser considerada um teste parasitológico ou direto, pois detecta fragmentos do parasita ou agente investigado. Um hospedeiro positivo em testes sorológicos e negativo ao exame direto pode ter sido exposto à infecção, o que não representa, necessariamente, sua capacidade de transmitir o agente ou de mantê-lo na natureza (36). De modo contrário, infecções recentes podem resultar na detecção de um agente por métodos diretos, com resultados negativos em testes sorológicos que pesquisam imunoglobulinas da classe IgG.

Técnicas de exame direto são, em geral, menos efetivas para fins de detecção de agentes como *Leishmania* em animais silvestres, o que justifica os resultados negativos do exame direto de lâminas de esfregaço sanguíneo. A PCR, por sua vez, é uma técnica extremamente sensível, mas seu uso para diagnóstico de animais silvestres ainda é um desafio e requer padronização (36).

Um achado interessante foi a detecção do DNA de *T. cruzi* em duas amostras sanguíneas de um mesmo *D. albiventris*, colhidas em um intervalo de três meses e a uma distância de cerca de oito quilômetros entre os pontos de captura. Não se pode descartar a possibilidade de o animal ter atuado na manutenção e dispersão do parasita nesse intervalo de tempo e espaço. Entretanto, não é possível fazer tal inferência somente baseando-se na detecção molecular do parasita.

Assim, com base nos resultados, não é possível afirmar que este animal apresentava parasitemia, ou seja, que o parasita encontrava-se viável e em número suficiente na circulação sanguínea para ser transmitido a um vetor. Ainda que a parasitemia fosse comprovada por técnicas de isolamento ou xenodiagnóstico (36), não seria possível

determinar sua duração, ou seja, se o gambá infectado apresentou o parasita no sangue de modo constante ou intermitente no intervalo de três meses.

A realização da cPCR para diferentes regiões-alvo de *Leishmania* e *T. cruzi* permitiu obter maior sensibilidade no diagnóstico molecular. A associação dos resultados obtidos com cada *primer* possibilitou a identificação de um maior número de indivíduos infectados: dentre os cinco mamíferos detectados com *Leishmania*, três foram identificados na ITS1-cPCR e dois nas reações para o kDNA de *L. (L.) infantum*. Um dos gambás detectados com infecção por *T. cruzi* foi identificado somente com o uso dos *primers* P35/P36, bem como a amostra colhida de um *D. albiventris* recapturado.

A cPCR para a região HSP70 de *Leishmania* não permitiu confirmar a infecção de nenhum dos mamíferos examinados por sequenciamento genético, embora amostras sanguíneas de 20 animais tenham amplificado fragmento de tamanho esperado nessas reações, incluindo amostras de dois gambás confirmados com a infecção pelo parasita na ITS1-cPCR.

Juntamente com as regiões do kDNA e ITS1, HSP70 está entre os alvos moleculares mais amplamente empregados devido à sua abundância em número de cópias no genoma de *Leishmania* (247). Os *primers* HSP70 utilizados foram desenhados para a técnica de HRM, para diferenciação de espécies de *Leishmania* nas Américas (247).

É importante observar que dentre as amostras sanguíneas que amplificaram com o uso dos *primers* HSP70, quatro delas (animais #024, #025, #026 e #043) também exibiram ampliações na cPCR para a região ITS1 de *Leishmania* e para a região do minicírculo do kDNA de *T. cruzi* (*primers* P35/P36). Entretanto, também não foi possível confirmar a identidade dos produtos amplificados nessas reações por sequenciamento genético.

Quando analisados em conjunto, esses resultados podem indicar a infecção desses animais por outra espécie de tripanossomatídeo ou mesmo de coinfeções, que podem interferir na amplificação da região-alvo e, consequentemente, nos resultados de sequenciamento. Portanto, as prevalências de animais detectados com infecção por *Leishmania* spp. (6,1%; 5/82) e por *T. cruzi* (3,7%; 3/82) podem estar subestimadas, uma vez que foram calculadas baseando-se apenas em resultados de PCR confirmados por sequenciamento genético.

O uso dos *primers* para a região ITS1 permitiu também identificar a infecção de um *D. albiventris* por *T. rangeli*, parasita não patogênico ao homem e a animais domésticos e

silvestres, com ampla distribuição geográfica nas Américas Central e do Sul (232). Conforme citado na justificativa desta tese, sua detecção em um gambá motivou a pesquisa de infecções por *T. cruzi* na fauna silvestre da APA, tendo em vista que comumente há sobreposição na distribuição geográfica desses agentes, que competem biologicamente por hospedeiros mamíferos, particularmente marsupiais (232). A hipótese de circulação de *T. cruzi* foi, portanto, confirmada pelos resultados obtidos.

O uso de duas diferentes amostras biológicas (sangue e pele) também foi importante para aumentar a sensibilidade da detecção molecular de *L. (L.) infantum*, ou seja, foi identificado um maior número de mamíferos infectados utilizando-se as duas amostras, considerando-se que dentre os quatro animais detectados com o parasita, apenas um foi positivo em ambas.

O sucesso na detecção do DNA de *L. (L.) infantum* em amostras sanguíneas depende do grau de parasitemia (284). Nesse sentido, a técnica de qPCR possui a vantagem de detectar cargas parasitárias muito baixas (260,285) e, em relação à cPCR, destaca-se por sua rapidez, reprodutibilidade, menor risco de contaminação e possibilidade de quantificar a carga parasitária (286). Alguns autores demonstraram sua maior sensibilidade para detecção de *L. (L.) infantum* em amostras de humanos e cães (287,288), enquanto outros consideram que a afirmação de que sua sensibilidade é superior à da cPCR seja uma generalização (286).

Neste trabalho, a qPCR não permitiu a detecção e quantificação de *L. (L.) infantum* em amostras sanguíneas, mesmo naquelas identificadas como positivas nas reações convencionais (#002 e #079). A técnica foi utilizada a fim de aumentar a sensibilidade de detecção do parasita no sangue, que não é considerado como material biológico “ideal” para diagnóstico em cães e humanos, cuja sensibilidade é favorecida quando utilizadas amostras de biópsia ou punção de linfonodos, medula óssea, fígado e baço (289,290).

A obtenção dessas amostras exige, contudo, procedimentos invasivos (291) e um maior planejamento e logística, sendo de difícil realização em estudos epidemiológicos, especialmente envolvendo captura de animais silvestres. Além disso, pouco se conhece sobre os sítios de localização e multiplicação de *Leishmania* nas diferentes espécies silvestres (36,106) e, portanto, sobre quais seriam as amostras ideais para o diagnóstico nesses animais.

Para a identificação da espécie de *Leishmania* verificou-se que a cPCR associada ao sequenciamento genético foi suficiente em quatro das cinco amostras detectadas com o parasita. A determinação da espécie de *Leishmania* não foi possível somente para o produto

obtido na amostra sanguínea de um gambá (#086), identificado, entretanto, como pertencente ao subgênero *Viannia*.

Dentre as técnicas empregadas para a diferenciação de espécies de *Leishmania*, a MLEE (*multi locus enzyme electrophoresis*) é considerada padrão ouro (292), mas seu uso possui desvantagens importantes, como a necessidade de cultivo em massa de parasitas, dificuldade em sua implementação e tempo considerável de execução (249,293,294). Assim, diversos métodos têm sido aprimorados para este fim.

A técnica de HRM-qPCR tem sido descrita como capaz de detectar pequenas diferenças na composição nucleotídica de produtos específicos de qPCR, baseando-se em diferenças termodinâmicas no perfil das curvas de dissociação, possibilitando explorar polimorfismos e diferenciar cepas em uma única reação (295). Seu uso para diferenciação de *Leishmania* ainda é recente, particularmente em amostras clínicas de animais silvestres, com raros relatos no Velho Mundo, onde a diversidade de espécies de *Leishmania* patogênicas é menor (296–298).

Com o protocolo utilizado neste estudo, Hernández e colaboradores (247) diferenciaram seis espécies de *Leishmania* do Novo Mundo em isolados de humanos, vetores e mamíferos, com 100% de concordância com as técnicas tipicamente empregadas para caracterização das espécies do parasita, RFLP-PCR e MLEE.

A PCR-RFLP é em outra técnica amplamente utilizada para diferenciação de espécies de *Leishmania*. Trata-se de uma análise pós-PCR, em que o produto é digerido por endonucleases de restrição, gerando fragmentos de tamanho específico que são visualizados por eletroforese e identificados de acordo com o padrão de bandas resultante (249).

Todavia, neste trabalho as técnicas de HRM-qPCR e RLFP-PCR não permitiram identificar a espécie de *L. Viannia* envolvida na infecção do gambá #086, embora tenham possibilitado diferenciar cepas padrão de *Leishmania* e de amostras de linfonodo de casos autóctones de LVC da APA-Campinas, estas últimas com o uso da HRM-qPCR.

Esses resultados demonstram as dificuldades no uso de técnicas moleculares para diferenciação de espécies de *Leishmania* em amostras clínicas, ao invés do parasita isolado. Embora não seja uma tarefa simples, a identificação da espécie é de extrema importância para fins epidemiológicos, de taxonomia e para o diagnóstico e tratamento adequado de pacientes, especialmente em locais onde há ocorrência de diversas espécies do parasita (294).

Com relação à FMB, sabe-se da importância da enfermidade em Campinas, município com o maior número de casos registrados no estado de São Paulo nos últimos anos (299). A região da APA foi sinalizada por placas indicando a presença de carrapatos vetores, que foi, de fato, verificada durante os trabalhos de campo. Os cuidados com o uso de EPIs, repelentes e verificação do corpo foram imprescindíveis nesta etapa. Chamou a atenção o relato do administrador de uma propriedade rural onde estava situado um grande fragmento de mata armadilhado, sobre a presença de capivaras e carrapatos e a ocorrência de dois casos de FMB entre funcionários da propriedade, com desfecho fatal em um desses casos.

Considerando as características ecoepidemiológicas da área estudada e a conhecida circulação do agente, seus vetores e hospedeiros na região, esperava-se verificar a exposição (detecção de anticorpos) de gambás capturados à *R. rickettsii*. Contudo, verificou-se que somente um *D. albiventris* foi positivo à RIFI. O animal exibiu título de 128, apenas uma diluição acima do ponto de corte (1:64), o que pode indicar a infecção por outras espécies de riquetsias do grupo da FMB, considerando que há reação cruzada entre elas (300).

Outros estudos utilizaram a RIFI para detectar anticorpos anti-*R. rickettsii* em gambás, também amostrados no estado de São Paulo, entretanto, com amostras de tamanho inferior a deste estudo. As soroprevalências para *D. albiventris* foram de 20,0% (3/15) em Sorocaba; 50,0% (1/2) em São Bernardo do Campo; e 100,0% em Biritiba-Mirim (1/1) (301) e Paulicéia (5/5) (302). Para *D. aurita*, foram relatadas soroprevalências de 4,5% (1/22) na região metropolitana de São Paulo (195); 6,7% (1/15) em Sorocaba; 20,0% (1/5) em São Bernardo do Campo; 25,0% (3/12) em Biritiba-Mirim; 34,0% (17/50) em São Paulo; 50,0% (1/2) em Osasco; 60,0% (3/5) em Salesópolis (301); e 100,0% (17/17) em Peruibe (303).

Em outros estados brasileiros, foram relatadas soroprevalências de 12,5% (1/8), 31,6% (6/19) e 50,0% (2/4) em *D. albiventris*, respectivamente em Minas Gerais (304), Mato Grosso do Sul (305) e Rio Grande do Sul (306). Cabe ressaltar que os dados de soroprevalências nas diferentes localidades não são comparáveis, considerando-se, dentre outros fatores, as situações epidemiológicas distintas da FMB em cada local.

Os resultados negativos obtidos neste estudo podem representar a real ausência de anticorpos na amostra da população de gambás examinada, o que pode ocorrer em (i) animais nunca infectados com o agente; ou (ii) que se infectaram, mas ainda não haviam desenvolvido resposta imune humoral no momento da amostragem; ou ainda (iii) animais que se infectaram no passado, mas os anticorpos caíram a níveis indetectáveis.

Em condições experimentais, gambás (*D. aurita*) infectados com *R. rickettsii* desenvolveram níveis de anticorpos detectáveis à RIFI do quarto ao 12º dias pós-infecção, que permaneceram até o término do experimento, ao 180º dia. Dentre os cinco gambás que foram infectados por exposição experimental a carrapatos, um tornou-se soronegativo ao 130º dia pós-infecção e outro nunca foi soropositivo para o ponto de corte de 1:64 (307).

Resultados sorológicos negativos também podem ocorrer devido à má conservação da amostra de soro ou por problemas na execução da técnica. Entretanto, neste estudo foram observados os cuidados com a refrigeração das amostras de sangue até a centrifugação e o posterior armazenamento das amostras de soro a -80° C em várias alíquotas e em diferentes freezers. Além disso, a RIFI foi realizada em laboratório que realiza a técnica como rotina de atividades de vigilância e pesquisa.

Por outro lado, resultados negativos em técnicas moleculares para detecção de riquetsias do grupo da FMB são comuns, mesmo em localidades onde há circulação desses agentes e/ou de carrapatos vetores infectados (300,308–314). Os resultados de PCR negativos neste estudo estão, portanto, de acordo com a literatura, tendo em vista que relatos de detecção molecular em amostras de animais silvestres são pontuais (315–318).

Isso se deve à localização das riquetsias em células endoteliais e ao período de riquetsemia, em geral curto. Estudos indicam que, em condições experimentais, a duração da riquetsemia é de três a 13 dias em cães (319), de seis a 18 dias em capivaras (320) e de 16 a 30 dias em gambás da espécie *D. aurita* (307).

À medida que a FMB continua a representar risco à saúde humana, frente à sua alta letalidade, estudos envolvendo a fauna silvestre são importantes para entender como as riquetsias são mantidas em ciclos enzoóticos (321) e podem fornecer informações para auxiliar atividades de vigilância e controle (322).

Implicações epidemiológicas da detecção de mamíferos silvestres infectados pelos tripanossomatídeos patogênicos *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*

Dentre os oito mamíferos detectados com infecção por *Leishmania* ou *T. cruzi*, a maioria (sete) era gambás, incluindo duas diferentes espécies infectadas por *Leishmania*, *D. albiventris* e *D. aurita*. Apenas um sagui-do-tufo-preto foi detectado com *L. (L.) infantum*.

Embora também tenham representado a maioria (65%) dos mamíferos amostrados, os gambás são importantes, do ponto de vista epidemiológico, por serem considerados animais sinantrópicos, adaptando-se facilmente ao ambiente peridomiciliar, o que permite que frequentemente estejam em contato com humanos e animais domésticos (283), como ocorre na APA de Campinas.

No que diz respeito à infecção por *T. cruzi*, os gambás são importantes hospedeiros do parasita em ciclos enzoóticos, quando se considera a característica particular de eliminação do parasita na secreção de suas glândulas anais, o que os diferencia dos demais hospedeiros (109,135).

Gambás são também sugeridos como capazes de estabelecer um elo entre ciclos de transmissão rural e urbanos de LV no Brasil (323). À espécie *D. albiventris* é atribuído o papel de reservatório em ciclos de transmissão de *L. (L.) infantum* (58). O primeiro relato de isolamento do parasita nessa espécie ocorreu na Bahia (324), cuja infectividade ao vetor foi demonstrada posteriormente (325). A espécie *D. marsupialis* parece atuar na manutenção e transmissão de *L. (V.) guyanensis* nas áreas de ocorrência do parasita (64) e de *L. (L.) infantum* na Colômbia e Venezuela (84,326,327).

Já a espécie *D. aurita* tem sido estudada com menor frequência. A infecção natural dessa espécie por *L. (L.) infantum* foi registrada no Rio de Janeiro (328). Seu papel como reservatório não foi demonstrado, mas seu potencial em desempenhá-lo está relacionado à proximidade filogenética entre as espécies do gênero *Didelphis* (36).

É importante ressaltar que os gambás estão entre os animais silvestres cuja infecção por tripanossomatídeos é mais frequentemente estudada. É necessário, portanto, esclarecer o papel de outras espécies, investigadas com menos frequência, na transmissão desses parasitas.

A infecção natural de saguis (*Callithrix* spp.) por *Leishmania*, por exemplo, é ainda pouco estudada. Esse gênero de primatas neotropicais foi utilizado como modelo biológico em infecções experimentais com várias espécies do parasita (329–336). Para o estudo de infecções por *L. (L.) infantum*, Carneiro e colaboradores avaliaram esses animais como modelos biológicos inadequados, sugerindo-se que primatas do Novo Mundo tenham desenvolvido um mecanismo de resistência ao parasita, por resposta imune inata (336).

Há raros relatos da infecção natural de saguis por *L. (L.) infantum*, todos no estado de São Paulo, com evidência sorológica de infecção (337,338) e detecção molecular em amostras de linfonodo e de papa de leucócitos (338).

Neste trabalho, foi identificada, pela primeira vez, a presença do agente da LV em amostra de pele de um sagui. Sabe-se que a multiplicação abundante do parasita na derme de cães domésticos é um dos fatores que os caracterizam como reservatórios em áreas de transmissão (53). Entretanto, a simples detecção molecular do parasita em um sagui não é suficiente para implicar que animais dessa espécie atuem como reservatórios na área estudada (339). Estudos envolvendo um maior número de espécimes do gênero *Callithrix*, que utilizem técnicas capazes de mensurar a viabilidade, quantificação e transmissibilidade do parasita ao vetor, se fazem necessários para elucidar o papel desses animais em ciclos de transmissão de *L. (L.) infantum*, especialmente porque estão em crescente contato com o homem.

Quanto à detecção de um gambá infectado com *L. Viannia*, embora não tenha sido possível determinar a espécie de *Leishmania*, utilizando-se o BLASTn verificou-se que a sequência de DNA amplificada demonstrou maior percentual de identidade e menor *E value* quando comparada a sequências de *L. (V.) guyanensis*. Há, portanto, possibilidade de se tratar dessa espécie do parasita, que possui ocorrência aparentemente limitada à região Norte do Brasil, estendendo-se para as Guianas (64).

Além disso, pertencem ao subgênero *L. Viannia* espécies de *Leishmania* relacionadas à LT em humanos. O achado pode indicar a importância de ações de vigilância epidemiológica para prevenir a reemergência da enfermidade na região da APA, tendo em vista que em 1993-1994 houve um surto de LT entre moradores dessa área. Corte e colaboradores (45) descreveram o surto, associando-o à expansão urbana do município de Campinas para o interior do território da APA nas décadas de 1970 e 1980.

Também o surto de LVC em Campinas despertou a atenção para sua relação com o histórico de ocupação da APA e o contato próximo de cães com a mata e a fauna silvestre (47). No ano de 2009, por ocasião da investigação do primeiro caso canino autóctone, mamíferos silvestres das espécies *Nectomys squamipes* (rato d'água), *D. albiventris*, *C. penicillata* e *Gracilianus agilis* (cuíca), foram capturados em áreas arborizadas do condomínio onde o cão habitava. No total, 40 animais foram amostrados e avaliados por PCR, mas nenhum apresentou resultado positivo (47).

A proximidade entre residências e fragmentos de mata ou vegetação da APA foi verificada durante os trabalhos de campo, ilustrada na Figura 10, e também relatada durante a investigação em 2009, que apontou a proximidade de 100 m entre as residências e áreas de mata onde foram capturados flebotomíneos e mamíferos silvestres (47).

No estado do Rio de Janeiro, cães vivendo a 100 m ou menos de florestas apresentaram chance 3,49 vezes superior de estarem infectados com o agente da LV e a presença de gambás no peridomicílio aumentou 2,6 vezes a chance de infecção em cães. Foi registrada prevalência de anticorpos de 29,0% entre os 31 gambás capturados nessa área (340).

A manutenção de uma área de segurança entre habitações humanas e áreas de mata é uma medida recomendada no programa de controle da LV no Brasil. Isso se deve especialmente às características epidemiológicas da LV em décadas passadas e à distribuição do vetor *Lu. longipalpis*, originalmente encontrado em regiões de mata na região Norte e Nordeste do país (58).

A partir da década de 1980, entretanto, verificou-se um nítido processo de urbanização e expansão da LV, associado à adaptação de *Lu. longipalpis* (90). Sugere-se que essa adaptação tenha ocorrido por diversos processos, incluindo aqueles que foram verificados na APA de Campinas: expansão urbana associada ao desmatamento e deslocamento populacional para a periferia de grandes centros urbanos, que diminuem a disponibilidade de animais silvestres como fonte alimentar do vetor e colocam cães e humanos como alternativas mais acessíveis (58,61,341).

Situação bastante semelhante à da APA de Campinas foi investigada por Barroso *et al.* (342) na região do Chaco, na Argentina. Foram avaliados 77 cães que viviam em uma área de floresta onde ocorreram dois casos índices de LV humana, detectando-se 13,0% de prevalência de infecção por *Leishmania*. Os autores sugeriram que o início da ocorrência focal de casos caninos e humanos de LV numa região silvestre, endêmica para LT, com uma prevalência canina relativamente baixa, é claramente compatível com o envolvimento de mamíferos silvestres como reservatórios do parasita, hipótese que não deve ser descartada para “explicar” o foco de LVC na APA-Campinas.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a participação de animais da fauna silvestre no ciclo de transmissão da LV na APA, mas não é possível determinar quais hospedeiros foram primeiramente infectados. Ou seja, não se pode atribuir a origem da

transmissão do parasita entre cães a um ciclo enzoótico silvestre existente anteriormente; ou se cães infectados que foram introduzidos na APA serviram de fonte de infecção para a fauna silvestre; ou, ainda, se ambos os processos ocorreram.

Independente da origem da circulação de *L. (L.) infantum* entre animais da APA de Campinas, é importante analisar os resultados obtidos e o cenário ecoepidemiológico da LV nessa localidade à luz do programa nacional de controle da LV.

Os pilares do programa foram propostos há mais de 50 anos (343) e há problemas estruturais e dificuldades operacionais importantes que impedem que sejam executados com êxito, como a insuficiência de insumos, de recursos humanos e financeiros (344). As medidas atualmente recomendadas pelo Ministério da Saúde, baseadas principalmente no controle do reservatório canino e na aplicação de inseticidas, não têm sido suficientes para reduzir a prevalência em regiões endêmicas (84,341,345).

A baixa efetividade da eliminação de cães ocorre por uma combinação de fatores. Os cães são definidos como infectados baseando-se em técnicas sorológicas que podem ocasionar resultados falso-positivos ou falso-negativos (346), este último especialmente em cães assintomáticos (347). Os testes não refletem a capacidade do animal em infectar vetores e, portanto, de atuarem como reservatórios no ciclo de transmissão (346). Frequentemente há um longo intervalo entre a realização da sorologia e a eliminação do cão (53,348), além de resistência social à sua execução tendo em vista a relação afetiva com esses animais (344). Além disso, a substituição dos cães costuma ocorrer em taxas elevadas e rapidamente (84,349,350).

Na Europa, embora o cão seja considerado o principal reservatório em áreas endêmicas, reservatórios silvestres foram atribuídos à falta de sucesso no controle da LV (351). A participação de reservatórios silvestres nos ciclos de transmissão no Brasil também tem sido proposta (36,351).

Assim, a eliminação de cães como medida de controle da LV parece inadequada, particularmente em áreas como a APA, em que: (i) as residências humanas estão situadas no interior de áreas de mata; (ii) há baixa densidade populacional de *Lu. longipalpis*; (iii) há baixa incidência anual de casos caninos (48); (iv) há inúmeras dificuldades de execução das medidas de eliminação de cães, considerando-se que os casos ocorrem em residências de alto padrão socioeconômico, com acesso a veterinários particulares e a alternativas como o tratamento de cães doentes (344); (v) há presença de animais da fauna silvestre infectados

com o parasita e vivendo em proximidade com o homem e animais domésticos, o que foi verificado nesse estudo.

É clara, portanto, a necessidade de revisão do programa nacional de controle da LV, especialmente no que diz respeito à uniformidade das ações previstas. A proposição de medidas eficazes é, obviamente, um desafio, mas é fundamental que sejam medidas estratégicas, considerando as características particulares de cada área de transmissão. Ou seja, o contexto epidemiológico de cada área de transmissão deve influenciar o conjunto de medidas de controle da doença, para que sejam viáveis e com potencial de impacto nos âmbitos local e regional.

A recomendação de incluir medidas específicas a áreas rurais e silvestres foi proposta por outros autores. Curi e colaboradores (352) as recomendaram ao verificar que cães vivendo em áreas rurais do estado de Minas Gerais, localizadas em até dois quilômetros de cinco APA com fragmentos de Mata Atlântica, exibiram fatores de risco para LV distintos daqueles descritos para cães de áreas urbanas. Os autores sugeriram a esterilização dos cães para redução populacional, educação dos proprietários e limitação legal do número de cães por casa em habitações próximas a áreas silvestres (352).

Considerando as características socioeconômicas da população residente na área do foco de LVC na APA, medidas de proteção individual direcionadas aos cães podem ser úteis. Essas medidas têm sido amplamente difundidas ao redor do mundo nos últimos anos. Dentre elas, destaca-se o uso de repelentes e inseticidas tópicos ou em coleiras (353), cujo custo é uma limitação para uso em larga escala (89). A telagem de janelas e portas e a manutenção dos cães no interior das residências a partir do final da tarde também podem ser indicadas (58).

Há, ainda, uma vacina comercialmente disponível para cães no Brasil e que pode ser adquirida para imunização desses animais. Dois estudos recentes, realizados em 2016 e 2017, avaliaram o uso da vacina em ensaios de campo em áreas endêmicas. Em um desses estudos a imunização dos cães foi considerada significativamente efetiva para a profilaxia da LVC (354), enquanto o outro considerou a vacina promissora, mas estimou que a imunoprofilaxia, além da eliminação do reservatório canino, podem não impactar na redução da incidência de infecção entre cães em áreas com altas taxas de transmissão (355).

Não há, portanto, comprovação do impacto das medidas de proteção individual em cães no que diz respeito à diminuição da incidência da LV em humanos e, por esse

motivo, essas medidas ainda não são recomendadas pelo programa de controle (53,58,89,356).

Recentemente, o fármaco MilteforanTM (Virbac, Brasil), cujo princípio ativo é a miltefosina, foi registrado para tratamento canino no Brasil (Nota Técnica Conjunta MAPA/MS, nº 001/2016, 01/09/2016). A OMS recomenda que medicações utilizadas para o tratamento humano da LV não sejam empregadas no tratamento canino, não só pela baixa eficácia parasiticida nesses animais, mas pelo potencial em selecionar parasitas resistentes (53). Embora a miltefosina não seja utilizada para tratamento humano no Brasil, o fármaco tem sido empregado no tratamento de casos antimoniais-resistentes na Índia, desde 2002. No país, mais de 90% dos casos ocorrem em locais onde há resistência aos antimoniais pentavalentes (357).

Do ponto de vista da Saúde Única, é importante ressaltar que as medidas de controle que são direcionadas aos cães em áreas silvestres visam também à conservação da saúde da fauna que está em contato com esses animais. Foi sugerido que cães infectados com o agente da LV vivendo em áreas rurais e silvestres produzem um impacto ecológico maior que em saúde pública, ressaltando-se, porém, que não deve haver negligência com relação aos indivíduos humanos que vivem ou frequentam essas regiões (352).

A circulação de *T. cruzi* entre animais da fauna da APA também representa um achado importante. Embora os casos de doença de Chagas no Brasil sejam predominantemente resultantes de transmissão oral ou de casos crônicos de transmissão vetorial no passado (133,139), a certificação do Brasil como país livre de transmissão vetorial intradomiciliar por *T. infestans* não deve “anular” a existência de inúmeras outras espécies de triatomíneos com capacidade vetorial amplamente distribuídas nas Américas (358,359), que interagem com o ambiente em constante modificação e podem adaptar-se a novos ecótopos (360).

No Nordeste brasileiro, por exemplo, as espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* têm sido frequentemente relatadas em habitações humanas e sugeridas como espécies de importância epidemiológica na região (359,361–363). O último boletim epidemiológico com dados de vigilância entomológica de triatomíneos em São Paulo, referente ao período de 2007 a 2009 (360), relatou a espécie *T. sordida* como a mais prevalente, seguida por *P. megistus*, destacando a aproximação crescente desta última espécie a moradias humanas.

O controle da transmissão vetorial intradomiciliar também não elimina a possibilidade de transmissão vetorial ocasional, por invasão do homem a espaços silvestres (364). É importante observar que em áreas como a APA de Campinas, as residências estão construídas em meio à mata, havendo uma estreita relação entre o homem e a natureza, seja por parte de moradores ou de indivíduos que frequentam a área para atividades de ecoturismo.

A presença de gambás infectados nas proximidades das residências pode ocasionar em contaminação do ambiente e de alimentos com o conteúdo de suas glândulas anais, além de servirem como fonte de infecção a cães domésticos, quando estes circulam livremente nas áreas de mata, ou mesmo no peridomicílio, e podem caçar gambás infectados (365).

A possibilidade de transmissão de *T. cruzi* a cães por animais silvestres, como gambás e roedores, foi também discutida por Lucheis e colaboradores (366), quando verificaram altas taxas de infecção pelo parasita em cães que pertenciam a 30 indivíduos com doença de Chagas crônica na região de Botucatu, São Paulo, no ano de 2001. Os autores relataram que, embora não tenham sido capturados triatomíneos nas residências desses indivíduos, 86,0% (43/50) dos cães amostrados nos domicílios foram positivos por xenodiagnóstico e/ou isolamento e/ou PCR, incluindo-se 44,0% (22/50) de cães positivos simultaneamente pelos três métodos. Os autores não descartaram, ainda, a possibilidade de transmissão vetorial na região estudada.

Portanto, a circulação de *T. cruzi* entre animais da fauna silvestre, até então desconhecida na APA, atenta para a necessidade de ações de vigilância contínuas. Tendo em vista o cenário de interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans*, há risco de negligência da doença de Chagas, por parte das instituições responsáveis pela vigilância e controle da enfermidade no Brasil, especialmente diante da ocorrência de surtos de doenças de grande repercussão, como a dengue (133) e, mais recentemente, chikungunya, zika e febre amarela.

Considerações finais

As relações de interdependência entre saúde animal, humana e do meio ambiente são cada vez mais evidentes, mas há, ainda, alguns desafios a serem superados. A associação entre saúde humana e da fauna silvestre é, muitas vezes, negligenciada, quando comparada ao bem reconhecido vínculo entre o homem e animais domésticos (15).

A inclusão da fauna silvestre em atividades de vigilância ou de pesquisa é complexa, dentre outros fatores, devido ao difícil acesso a esses animais e à falta de validação de alguns testes diagnósticos (234). São necessários, contudo, maiores esforços globais e investimentos para detectar precocemente a circulação de patógenos entre animais da fauna silvestre, a fim de reduzir o risco de transmissão para o homem e seus animais domésticos (15) e de proteger a saúde da fauna e a biodiversidade.

A escassez de vacinas e medicamentos que possam ser efetivamente utilizados para controle de enfermidades em animais de vida livre faz com que sejam poucas as opções aplicáveis a esses animais (367). Impedir as perturbações ocasionadas por atividades humanas não é simples, mas a regulamentação e fiscalização dessas atividades é uma medida importante e possível.

Neste estudo, verificamos que mamíferos da fauna silvestre infectados por agentes de importantes enfermidades zoonóticas, LV e doença de Chagas, coabitam com o homem e animais domésticos em uma área protegida de remanescentes florestais. Essa proximidade foi ocasionada por um processo de urbanização, embora contra as diretrizes de uma área protegida. Ações de educação em saúde são necessárias para trabalhar essas informações junto à população que vive ou frequenta a APA-Campinas e que deve, portanto, conhecer a ocorrência dos parasitas na região e as formas de transmissão dessas zoonoses.

Considerando a proximidade verificada entre animais silvestres infectados pelo agente da LV com o homem e animais domésticos, além das características da transmissão da infecção na APA e a discussão sobre a eficácia da eliminação do reservatório canino, abordadas anteriormente, há necessidade de revisão do programa de controle brasileiro, para que medidas estratégicas possam ser adotadas de acordo com as particularidades de cada área de transmissão.

Tendo em vista as ações previstas no programa de vigilância da LV, são conhecidos os dados sobre a infecção canina e os vetores que ocorrem na região da APA. Entretanto, não há registros atuais dessas informações no que diz respeito à circulação do agente da doença de Chagas nessa região.

Assim, é importante elucidar, em estudos futuros, outros fatores relativos ao ciclo de transmissão de *T. cruzi* na APA, como o levantamento de espécies e da infecção de triatomíneos. Adicionalmente, para melhor avaliação dos riscos de infecção humana, o exame

de cães domésticos pode ser útil, tendo em vista que esses animais são propostos como sentinelas no Brasil (39,110,160).

Por fim, uma observação interessante é a de que as espécies *M. gouazoubira*, *C. penicillata*, e *D. aurita* não estão listadas no levantamento faunístico realizado pela EMBRAPA (237). Pretende-se, portanto, contribuir com este inventário.

7. CONCLUSÕES

- Verificou-se a circulação de *Leishmania* em animais da fauna silvestre da APA de Campinas, em áreas próximas ao foco de LVC, sugerindo a relação entre a infecção canina e de animais silvestres;
- Técnicas sorológicas evidenciaram a exposição de animais silvestres à *Leishmania*, sendo necessários estudos para validação do uso destas técnicas em diferentes espécies;
- A PCR convencional associada ao sequenciamento genético foi útil para detecção dos tripanossomatídeos patogênicos *L. (L.) infantum* e *T. cruzi*, e o uso de diferentes iniciadores atribuiu maior sensibilidade ao diagnóstico molecular;
- Não houve detecção de *L. (L.) infantum* em amostras sanguíneas dos mamíferos silvestres capturados pela técnica de qPCR, mas o parasita foi detectado em duas dessas amostras por meio da cPCR associada ao sequenciamento genético;
- As técnicas de HRM-qPCR e PCR-RFLP permitiram diferenciar espécies de *Leishmania* de cepas padrão, mas não identificaram a espécie do subgênero *Viannia* envolvida na infecção de um gambá, o que demonstra as dificuldades na aplicação dessas técnicas moleculares a amostras clínicas de mamíferos silvestres;
- O DNA de riquetsias do grupo da FMB não foi detectado nos mamíferos examinados, reiterando os relatos de testes moleculares negativos em amostras sanguíneas de animais silvestres;
- Embora apenas um gambá examinado tenha apresentado evidência de exposição à *R. rickettsii* por sorologia, estudos envolvendo a fauna silvestre devem ser incentivados, pois ajudam a entender como as riquetsias são mantidas em ciclos naturais;
- A infecção de mamíferos silvestres por agentes de zoonoses com potencial importância à saúde pública capturados em áreas de habitações humanas reforça a preocupação crescente em relação às modificações ambientais e fragmentação de habitats.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cunningham AA, Daszak P, Wood JLN, Cunningham AA. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2017;372(1725):pii: 20160167.
2. Chatterjee P, Sarma N, Hansda S. Tropical diseases on insurgence: clinician's perspective. *Indian J Dermatol*. 2017;62(5):468–77.
3. Omran AR. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q*. 1971;49(4):509–38.
4. Omran AR. The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. 1971. *Milbank Q*. 2005;83(4):731–57.
5. Santosa A, Wall S, Fottrell E, Högberg U, Byass P. The development and experience of epidemiological transition theory over four decades: a systematic review. *Glob Health Action*. 2014;7:23574.
6. Barreto ML, Carmo EH, Noronha CV, Neves RBB, Alves PC. Mudanças dos padrões de morbimortalidade: uma revisão crítica das abordagens epidemiológicas. *Physis Rev Saúde Coletiva*. 1993;3(1):127–46.
7. Omran AR. The epidemiologic transition theory revisited thirty years later. *World Heal Stat Q*. 1998;51(2–4):99–119.
8. Sanders JW, Fuhrer GS, Johnson MD, Riddle MS. The epidemiological transition: the current status of infectious diseases in the developed world versus the developing world. *Sci Prog*. 2008;91(Pt 1):1–37.
9. Rogers RG, Hackenberg R. Extending epidemiologic transition theory: a new stage. *Soc Biol*. 1987;34(3–4):234–43.
10. Frenk J, Frejka T, Bobadilla JL, Stern C, Lozano R, Sepúlveda J, et al. La transición epidemiológica en América Latina. *Boletín la Of Sanit Panam*. 1991;111(6):485–96.
11. Harrus S, Baneth G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *Int J Parasitol*. 2005;35:1309–18.
12. OIE. World Organisation for Animal Health. One health. [Internet]. 2017 [acesso em 24 de junho de 2017 Jun 24]. Disponível em: <http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth>
13. PAHO. Pan American Health Organization. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: parasitoses. 3rd ed. Vol. 3. Washington, DC; 2003. 408 p.
14. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451:990–4.
15. Mackenzie JS, Jeggo M, Daszak P, Richt JA, editors. Current topics in microbiology and immunology. One Health: the human – animal – environment interfaces in emerging infectious diseases. The concept and examples of a One Health approach. Berlin: Springer-Verlag; 2013. 358 p.

16. Thompson RCA. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *Int J Parasitol.* 2013;43:1079–88.
17. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. One Health [Internet]. 2016 [acesso em 27 de junho de 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history/index.html>
18. Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Tanner M. From “One Medicine” to “One Health” and systemic approaches to health and well-being. *Prev Vet Med.* 2011;101(3–4):148–56.
19. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol.* 2000;30:1395–405.
20. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* 2001;78(2):103–16.
21. McKinney ML. Urbanization, biodiversity and conservation. *Bioscience.* 2002;52(10):883–90.
22. Mackenstedt U, Jenkins D, Romig T. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2015;4(1):71–9.
23. Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife–livestock–human interface. *Trends Ecol Evol.* 2017;32(1):55–67.
24. Silva LJ da. O conceito de espaço na epidemiologia das doenças infecciosas. *Cad Saude Publica.* 1997;13(4):585–93.
25. Young HS, Parker IM, Gilbert GS, Sofia Guerra A, Nunn CL. Introduced species, disease ecology, and biodiversity–disease relationships. *Trends Ecol Evol.* 2017;32(1):41–54.
26. Cleaveland S, Hess GR, Dobson AP, Laurenson MK, McCallum HI, Roberts MG, et al. The role of pathogens in biological conservation. In: Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP, editors. *The ecology of wildlife diseases.* Oxford, U.K.: Oxford University Press; 2002. p. 139–50.
27. Almeida MA de, Santos E dos, Cruz Cardoso J da, Fonseca DF da, Noll CA, Silveira VR, et al. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. *Am J Primatol.* 2012;74(1):68–76.
28. Fernandes NCC de A, Cunha MS, Guerra JM, Réssio RA, Cirqueira C dos S, Iglesias SD, et al. Outbreak of yellow fever among nonhuman primates, Espirito Santo, Brazil, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(12):2038–41.
29. Ostfeld RS, Keesing F. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can J Zool.* 2000;78:2061–78.
30. Civitello DJ, Cohen J, Fatima H, Halstead NT, Liriano J, McMahon TA, et al. Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(28):8667–71.
31. Woolhouse ME, Taylor LH, Haydon DT. Population biology of multihost pathogens. *Science.* 2001;292(5519):1109–12.
32. Plowright RK, Parrish CR, McCallum H, Hudson PJ, Ko AI, Graham AL, et al. Pathways to zoonotic

spillover. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(8):502–10.

33. Ostfeld RS, Keesing F. Biodiversity and disease risk: the case of Lyme disease. *Conserv Biol.* 2000;14(3):722–8.

34. Dobson A, Cattadori I, Holt RD, Ostfeld RS, Keesing F, Krichbaum K, et al. Sacred cows and sympathetic squirrels: the importance of biological diversity to human health. *PLoS Med.* 2006;3(6):714–8.

35. Khalil H, Ecker F, Evander M, Magnusson M, Hörnfeldt B. Declining ecosystem health and the dilution effect. *Sci Rep.* 2016;6(1):31314.

36. Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014;3(3):251–62.

37. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(12):1468–73.

38. Ashford RW. What it takes to be a reservoir host. *Belgian J Zool.* 1997;127:85–90.

39. Jansen AM, Roque ALR. Domestic and wild mammalian reservoirs. In: Telleria J, Tibyarenc M, editors. *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. 1st ed. London: Elsevier; 2010. p. 249–76.

40. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Campinas [Internet]. 2017 [acesso em 2 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350950>

41. Seplama. Secretaria de Planejamento e Meio Ambiente. Prefeitura Municipal de Campinas. Plano de gestão da área de proteção ambiental da região de Sousas e Joaquim Egídio, APA municipal [Internet]. 1996. 177 p. [acesso em 20 de abril de 2014]. Disponível em: www.campinas.sp.gov.br/governo/seplama/planos-locais-de-gestao/doc/plgapa.pdf

42. Fernandes AMV. A mercantilização da natureza e as novas territorialidades nos distritos de Sousas e Joaquim Egídio (Campinas-SP) [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Geociências; 2009.

43. Santin DA. A vegetação remanescente do município de Campinas (SP): mapeamento, caracterização fisionômica e florística, visando a conservação [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 1999.

44. PMC. Prefeitura Municipal de Campinas. Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas [Internet]. 2009 [acesso em 9 de março de 2013]. Disponível em: <http://www.apacampinas.cnpm.embrapa.br>

45. Corte AA, Nozawa MR, Ferreira M do C, Pignatti MG, Rangel O, Lacerra SS. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas. *Cad Saude Publica.* 1996;12(4):465–72.

46. Savani ESM, Presotto D, Roberto T, Camargo MCG de O, Nicoletti DSR, Sacramento DV. First occurrence of an autochthonous canine case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in the municipality of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Rev do Inst Med Trop São Paulo.* 2011;53(4):227–9.

47. von Zuben APB, Angerami RN, Castagna C, Baldini MBD, Donalisio MR. The first canine visceral

- leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3):385–8.
48. Donalisio MR, Paiz LM, da Silva VG, Richini-Pereira VB, von Zuben APB, Castagna CL, et al. Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7).
 49. PMC. Prefeitura Municipal de Campinas. SMS. Secretaria Municipal de Saúde. CVS. Coordenadoria de Vigilância em Saúde. Informe febre maculosa brasileira 03/03/2011 [Internet]. 2011 [acesso em 7 de março de 2018]. Disponível em: http://www.saude.campinas.sp.gov.br/doencas/febremaculosa/Informe_Tecnico_FMB_03032011.pdf
 50. Tonon F. Campinas totaliza cinco mortes por febre maculosa. *Correio Popular* [Internet]. 2014 [acesso em 25 de novembro de 2016]. Disponível em: http://correio.rac.com.br/_conteudo/2014/12/capa/campinas_e_rmc/229599-campinas-totaliza-cinco-mortes-por-febre-maculosa.html
 51. Avancini M. Campinas vai alertar população sobre febre maculosa [Internet]. Prefeitura Municipal de Campinas. 2012 [acesso em 25 de novembro de 2016]. Disponível em: <http://www.campinas.sp.gov.br/noticias-integra.php?id=16213>
 52. DEVISA. Departamento de Vigilância em Saúde. SMS. Secretaria Municipal de Saúde de Campinas. Informe Epidemiológico Arboviroses [Internet]. 2018 [acesso em 7 de março de 2018]. Disponível em: http://www.saude.campinas.sp.gov.br/saude/vigilancia/informes/2018/Informe_Epid_Arboviroses_28_fev_2018.pdf
 53. WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March, 2010. WHO technical report series n. 949. Geneva: WHO Press; 2010. 201 p.
 54. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*. 2000;30:1269–81.
 55. Curi NH de A, Miranda I, Talamoni SA. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(1):99–101.
 56. WHO. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO Press; 2013. 67-71 p.
 57. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004349.
 58. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. 120 p.

59. Cupolillo E, Noyes H, Momen H, Jr GG. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000;16(4):142–4.
60. Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 May 29;104(22):9375–80.
61. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo. São Paulo: A Secretaria; 2006. 161 p.
62. Marcondes CB. Entomologia médica e veterinária. São Paulo: Atheneu; 2001. 432 p.
63. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604–15.
64. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 189 p.
65. WHO. World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. *Relev Epidemiol Hebd*. 2017;92(38):557–65.
66. Brasil. Ministério da Saúde. Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. [Internet]. 2017 [acesso em 20 de novembro de 2017]. Disponível em: <http://www.portalarquivos.saude.gov.br>
67. Camargo LMA, Barcinski MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Cienc Cult*. 2003;55(1):34–7.
68. Cunha AM, Chagas E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. *O Hosp*. 1937;11:3–9.
69. Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 1999 Sep;119:237–46.
70. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000;16(5):188–9.
71. Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, et al. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(7):e261.
72. Kuhls K, Zahangir M, Cupolillo E, Ferreira GEM, Isabel L, Oddone R, et al. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1155.
73. dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1998 Jul;12(3):315–7.
74. Missawa NA, Lima GBM. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(4):337–40.

75. Oliveira EF de, Oshiro ET, Fernandes W de S, Murat PG, Medeiros MJ de, Souza AI, et al. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005401.
76. Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2005;128(1–2):149–55.
77. Dantas-torres F, Lorusso V, Testini G, Paiva-cavalcanti M De, Figueredo LA, Stanneck D, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res*. 2010;106:857–60.
78. Dantas-torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol*. 2011;27(4):155–9.
79. de Moraes RCS, Gonçalves S da C, Costa PL, da Silva KG, da Silva FJ, Silva RP, et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Exp Appl Acarol*. 2013;59(4):473–81.
80. Campos JHF, Costa FAL. Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(4):297–300.
81. Medeiros-silva V, Gurgel-gonçalves R, Nitz N, Emilia L, Morales DA, Cruz LM, et al. Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. *BMC Vet Res*. 2015;11:258.
82. Dabaghmanesh T, Asgari Q, Moemenbellah-fard MD. Natural transovarial and transstadial transmission of *Leishmania infantum* by naïve *Rhipicephalus sanguineus* ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016;110(7):408–13.
83. Viol MA, Guerrero FD, César B, Oliveira M De, Conceição M, Aquino C De, et al. Identification of *Leishmania* spp . promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitol Res*. 2016;115(9):3479–84.
84. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009;136(14):1915–34.
85. von Stebut E. Leishmaniasis. *J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft*. 2015;13(3):191–201.
86. WHO. World Health Organization. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a manual for case management and control: report of a WHO consultative meeting, Kolkata, India, 2-3 July 2012. 2013. 29 p.
87. Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 2013;50(5):341–52.
88. Migone LE. Un caso de kala-azar en Assunción (Paraguay). *Bull Soc Pathol Exot*. 1913;6:118–20.
89. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Rev Saude Publica*. 2014;48(5):851–5.
90. Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil.

Introduction. Cad Saude Publica. 2008;24(12):2937–40.

91. Ciaravolo RM de C, Oliveira SS de, Hiramoto RM, Henriques L de F, Taniguchi HH, Viviani Junior A, et al. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, dezembro de 2014. In: BEPA Boletim Epidemiológico Paulista. 2015. p. 9–22.
92. Moshfe A, Mohebbali M, Edrissian G, Zarei Z, Akhoundi B, Kazemi B, et al. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection. Acta Trop. 2009;112(2):101–5.
93. Moshfe A, Mohebbali M, Afshoun E, Mousavizadeh A, Zarei Z, Abidi H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Boyer Ahmad District, Kohgiluyeh & Boyer Ahmad Province, southwest of Iran. Iran J Parasitol. 2012;7(4):75–81.
94. Baneth G, Koutinas AF, Solano-gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008;25(7):324–30.
95. Savani ESMM, de Oliveira Camargo MCG, de Carvalho MR, Zampieri RA, dos Santos MG, D'Áuria SRN, et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol. 2004;120(3):229–33.
96. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol. 2007;145(3–4):357–60.
97. da Silva SM, Rabelo PFB, Gontijo N de F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. Vet Parasitol. 2010;174(1–2):150–4.
98. Alexander B, Lopes de Carvalho R, McCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis. 2002;8(12):1480–5.
99. Souza NP, Almeida A do BPF de, Freitas TPT de, Paz RCR da, Dutra V, Nakazato L, et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):333–5.
100. Jusi MMG, Starke-Buzetti WA, Oliveira TM ferreira de S, Tenório M da S, de Souza L de O, Machado RZ. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011;20(3):219–22.
101. Tenório M da S, de Oliveira e Sousa L, Paixão M dos S, Alves MF, Paulan S de C, Lima FL, et al. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. J Zoo Wildl Med. 2011;42(4):608–16.
102. Luppi MM, Malta MC, Silva TM, Silva FL, Motta RO, Miranda I, et al. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet Parasitol. 2008;155(1–2):146–51.
103. Ferreira PRB, Lorangeira DF, Oliveira LS de, Malta M de CC, Gomes MC, Bastos BL, et al. Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. Pesqui Vet Bras. 2013;33(4):528–34.
104. Malta MCC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira ALS, Costa ÉA, Santos RL. Naturally acquired visceral

leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet Parasitol.* 2010;169(1–2):193–7.

105. Díaz-sáez V, Merino-espinosa G, Morales-yuste M, Corpas-lópez V. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet Parasitol.* 2014;202(3–4):119–27.

106. Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(2):e589.

107. Barros JHS, Xavier SCC, Bilac D, Lima VS, Dario MA, Jansen AM. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. *Acta Trop.* 2017;172:173–9.

108. Xavier SC, Roque AL, Bilac D, de Araújo VA, da Costa Neto SF, Lorosa ES, et al. Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5):e2878.

109. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 2015;151:1–15.

110. Roque AL, Jansen AM. Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(Supl. III):191–3.

111. Ferreira LF, Jansen AM, Araújo A. Chagas disease in prehistory. *An Acad Bras Cienc.* 2011;83(3):1041–4.

112. Kribs-Zaleta CM. Graphical analysis of evolutionary trade-off in sylvatic *Trypanosoma cruzi* transmission modes. *J Theor Biol.* 2014;353:34–43.

113. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(7):1051–4.

114. Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1328–32.

115. Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunubá ZM, Guhl F. Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. *Infect Genet Evol.* 2012;12(8):1743–50.

116. Ramírez JD, Hernández C. *Trypanosoma cruzi* I: Towards the need of genetic subdivision?, Part II. *Acta Trop* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;pii: S0001(17):30250–4 [Epub ahead of print]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.005>

117. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo*

Cruz. 1909;1(2):159–218.

118. WHO. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 2015;90:33–44.

119. WHO. World Health Organization. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. WHO technical report series, 905; 2002. 120 p.

120. WHO. World Health Organization. WHO Media Centre. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. 2017 [acesso em 29 de junho de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

121. Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis. 2010;10(8):556–70.

122. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;375(9723):1388–402.

123. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(7):e3010.

124. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 2010;115(1–2):14–21.

125. Montgomery SP, Starr MC, Cantey PT, Edwards MS, Meymandi SK. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(5):814–8.

126. Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(4):e1136.

127. Cantey PT, Stramer SL, Townsend RL, Kamel H, Ofafa K, Todd CW, et al. The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. Transfusion. 2012 Sep;52(9):1922–30.

128. Moncayo Á, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(Suppl. 1):17–30.

129. Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2015;15(11):1347–56.

130. Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. J Trop Med. 2012;ID 705326.

131. Bern C. Chagas' disease. N Engl J Med. 2015;373(5):456–66.

132. Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? Trends Parasitol. 2014;30(4):176–82.

133. OPAS. Organización Panamericana de la Salud. XVIIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental (CI) de la Iniciativa Subregional Cono Sur de Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Transmisión Transfusional de la Tripanosomiasis American. 2011. 39 p.

134. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60(1):25–32.
135. Roque ALR, Xavier SCC, Rocha MG, Duarte ACM, Andrea PSD, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(5):742–9.
136. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot*. 2009;72(2):441–6.
137. OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPAS/OMS; 2009. 92 p.
138. Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1984;79(4):513–5.
139. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol Epidemiológico*. 2015;46(21):1–9.
140. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845–52.
141. Forattini OP, Rocha e Silva EO da, Barata JMS, Boainain E. Nota sobre caso autóctone de tripanossomíase americana no litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1980;14:143–9.
142. Toso MA, Vial UF, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chil*. 2011;139:258–66.
143. Lima VS, Iniguez AM, Otsuki K, Fernando Ferreira L, Araújo A, Vicente ACP, et al. Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(6):1001–2.
144. Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(Suppl 1):9–16.
145. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci United States*. 2004;101(7):2034–9.
146. Llewellyn MS, Rivett-Carnac JB, Fitzpatrick S, Lewis MD, Yeo M, Gaunt MW, et al. Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection. *Int J Parasitol*. 2011;41(6):609–14.
147. Dario MA, Rodrigues MS, Barros JH, Xavier SC, D'Andrea PS, Roque AL, et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors*. 2016;9:477.
148. Gürtler RE, Cardinal MV. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2015;151:32–50.

149. Rojo G, Sandoval-Rodríguez A, López A, Ortiz S, Correa JP, Saavedra M, et al. Within-host temporal fluctuations of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units: the case of the wild reservoir rodent *Octodon degus*. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):380.
150. Fernandes O, Mangia RH, Lisboa C V, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*. 1999;118(Pt 2):161–6.
151. Browne AJ, Guerra CA, Alves R V, Da Costa VM, Wilson AL, Pigott DM, et al. The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans, alternative hosts and vectors. *Sci Data*. 2017;4:170050.
152. Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: Adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res*. 2009;40(2).
153. Herrera HM, Lisboa C V, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, et al. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(11):1133–9.
154. Herrera HM, Abreu UGP, Keuroghlian A, Freitas TP, Jansen AM. The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Br. *Parasitol Res*. 2008;103:619–24.
155. Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “bat seeding” hypothesis. *Trends Parasitol*. 2012;28(4):136–41.
156. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2014;7:317.
157. Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, et al. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasit Vectors*. 2015;8:482.
158. Gurtler R, Cecere M, Lauricella M, Cardinal M, Kitron U, Cohen J. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*. 2007;134(Pt 1):69–82.
159. Eloy LJ, Lucheis SB. Hemoculture and polymerase chain reaction using primers TCZ1/TCZ2 for the diagnosis of canine and feline trypanosomiasis. *ISRN Vet Sci*. 2012;2012:419378.
160. Castillo-Neyra R, Chou Chu L, Quispe-Machaca V, Ancca-Juarez J, Malaga Chavez FS, Bastos Mazuelos M, et al. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev Vet Med*. 2015;120(3–4):349–56.
161. Walker DH. Rickettsiae. In: Baron S, editor. *Medical microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. p. 1273.
162. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(4):657–702.
163. Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos*

Soc. 2011;86(2):379–405.

164. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):694–719.

165. Walker DH. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. Clin Infect Dis. 2007;45(Suppl. 1):S39–44.

166. Sexton DJ, Walker DH. Spotted fever group rickettsioses. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 323–8.

167. Labruna MB. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. In: Moreira JR, Ferraz KMPMB, Herrera EA, Macdonald DW, editors. Capybara: biology, use and conservation of an exceptional Neotropical species. Springer US; 2013. p. 371–83.

168. Angerami RN, Resende MR, Feltrin AFC, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RSB, et al. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in Southeastern Brazil. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:252–4.

169. de Lima VLC, Figueiredo AC, Pignatti MG, Modolo M. Febre maculosa no município de Pedreira - estado de São Paulo - Brasil. - Relação entre ocorrência de casos e parasitismo humano por ixodídeos. Rev Soc Bras Med Trop. 1995;28(2):135–7.

170. Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Ann N Y Acad Sci. 2009;1166:156–66.

171. Pinter A, França AC, de Souza CE, Sabbo C, do Nascimento EMM, dos Santos FC, et al. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista - Suplemento - Febre maculosa brasileira. Vol. 8. 2011. 32 p.

172. Calic SB, Barcellos-Rocha CM, Leite RC, Mafra CL, Galvão MAM. Old and new human rickettsiosis in Minas Gerais State, Brazil. Ann N Y Acad Sci. 2005;1063(1):356–7.

173. Greca H, Langoni H, Souza LC. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2008;14(1):3–18.

174. de Lima VLC, de Souza SSL, de Souza CE, Vilela MFG, Papaiordanou PMO, Del Guércio VMF, et al. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. Cad Saude Publica. 2003;19(1):331–4.

175. Oliveira SV De, Guimarães JN, Reckziegel GC, Mariano B, Araújo-vilges KM De, Fonseca LX, et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2016;22(1):22.

176. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre maculosa [Internet]. 2017 [acesso em 24 de abril de 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/febre-maculosa>

177. SES. Secretaria de Estado da Saúde. Casos confirmados autóctones de FMB de residentes no estado de São Paulo segundo município de infecção e ano de início de sintomas, período de 2007 a 2017 [Internet]. 2017 [acesso em 24 de abril de 2017]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e>

zoonoses/dados/fmaculosa/fmb0717_lpi.pdf

178. Leiby DA, Gill JE. Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats. *Transfus Med Rev.* 2004;18(4):293–306.
179. Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;990:1–11.
180. Helmick CG, Bernard KW, D'Angelo LJ. Rocky Mountain spotted fever: clinical, laboratory, and epidemiological features of 262 cases. *J Infect Dis.* 1984;150(4):480–8.
181. Angerami RN, Câmara M, Pacola MR, Rezende RCM, Duarte RMR, Nascimento EMM, et al. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3:345–7.
182. Elkhoury ANSM, Mancini DM, Martins EC, de Carvalho JLB, Couto RD. Febre maculosa brasileira. In: BRASIL Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica Guia de vigilância epidemiológica. 7th ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 816.
183. Angerami RN, da Silva AM, Nascimento EM, Colombo S, Wada MY, dos Santos FC, et al. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(Suppl. 2):207–8.
184. Del Fiol F de S, Junqueira FM, da Rocha MC, de Toledo MI, Barberato Filho S. A febre maculosa no Brasil. *Rev Panam Salud Pública.* 2010;27(10):461–6.
185. Couto DV, Hans Filho G, Barbosa AB, Medeiros MZ, de Lima AM, Vicari CFS. Brazilian spotted fever: the importance of dermatological signs for early diagnosis. *An Bras Dermatol.* 2015;90(2):248–50.
186. Moerbeck L, Vizzoni VF, Machado-Ferreira E, Cavalcante RC, Oliveira S V., Soares CAG, et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) vector biodiversity in High Altitude Atlantic Forest fragments within a semiarid climate: a new endemic area of spotted-fever in Brazil. *J Med Entomol.* 2016;53(6):1458–66.
187. Labruna MB, Santos FCP, Ogrzewalska M, Nascimento EMM, Colombo S, Marcili A, et al. Genetic identification of rickettsial isolates from fatal cases of Brazilian spotted fever and comparison with *Rickettsia rickettsii* isolates from the American continents. *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3788–91.
188. Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(3):521–3.
189. Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EAG, et al. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(2):275–8.
190. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Ticks Tick Borne Dis.* 2001;32(6):897–928.
191. Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078:523–30.
192. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species,

- Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5:252–76.
193. Cunha NC, Fonseca AH, Rezende J, Rozental T, Favacho ARM, Barreira JD, et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. Pesqui Vet Bras. 2009;29(2):105–8.
194. Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, et al. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Med Vet Entomol. 2011;25(2):148–55.
195. Ogrzewalska M, Saraiva DG, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. Parasitology. 2012;139(10):1283–300.
196. Dantas-torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(1):64–7.
197. Serra-Freire NM. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2010;19(3):141–7.
198. Medeiros AP, Souza AP De, Moura AB De, Lavina MS, Bellato V, Sartor AA, et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(8):926–30.
199. Barbieri ARM, Filho JM, Nieri-bastos FA, Souza JC, Szabó MPJ, Labruna MB. Ticks and tick-borne diseases epidemiology of *Rickettsia* sp . strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5(6):848–53.
200. Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB, Szabó J, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:Article 27.
201. Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J, et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. Clin Infect Dis. 2004;38(6):805–11.
202. Portillo A, García-García C, Sanz MM, Santibáñez S, Venzal JM, Oteo JA. Case report: a confirmed case of *Rickettsia parkeri* infection in a traveler from Uruguay. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(6):1203–5.
203. Nava S, Elshenawy Y, Eremeeva ME, Sumner JW, Mastropaolo M, Paddock CD. *Rickettsia parkeri* in Argentina. Emerg Infect Dis. 2008;14(12):1894–7.
204. Nieri-Bastos FA, Szabó MPJ, Pacheco RC, Soares JF, Soares HS, Moraes-Filho J, et al. Comparative evaluation of infected and noninfected *Amblyomma triste* ticks with *Rickettsia parkeri*, the agent of an emerging rickettsiosis in the New World. Biomed Res Int. 2013;2013:402737.
205. Monje LD, Nava S, Antoniazzi LR, Colombo VC, Beldomenico PM. In vitro isolation and infection intensity of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* ticks from the Paraná River Delta region, Argentina. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5(6):924–7.
206. Widmer CE, Azevedo FCC, Almeida AP, Ferreira F, Labruna MB. Tick-borne bacteria in free-Living Jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2011;11(8):1001–5.

207. Melo ALT, Alves AS, Nieri-Bastos FA, Martins TF, Witter R, Pacheco TA, et al. *Rickettsia parkeri* infecting free-living *Amblyomma triste* ticks in the Brazilian Pantanal. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6(3):237–41.
208. Silveira I, Pacheco RC, Szabó MPJ, Ramos HGC, Labruna MB. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):1111–3.
209. Weck B, Dall'Agnol B, Souza U, Webster A, Stenzel B, Klafke G, et al. Spotted Fever Group *Rickettsia* in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(11):2014–6.
210. Weck B, Dall'Agnol B, Souza U, Webster A, Stenzel B, Klafke G, et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. *Acta Trop.* 2017;171:182–5.
211. Dall'Agnol B, Souza UA, Weck B, Trigo TC, Jardim MMA, Costa FB, et al. *Rickettsia parkeri* in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2017;[Epub ahead of print]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29119703>
212. Raoult D, La Scola B, Enea M, Fournier P, Roux V, Fenollar F, et al. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(1):73–81.
213. Oliveira RP, Galvão MAM, Mafra CL, Chamone CB, Calic SB, Silva SU, et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(3):317–9.
214. Galvão MA, Zavala-Velazquez JE, Zavala-Castro JE, Mafra CL, Calic SB, Walker DH. *Rickettsia felis* in the Americas. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1078:156–8.
215. Horta MC, Ogrzewalska M, Azevedo MC, Costa FB, Ferreira F, Labruna MB. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from five geographic regions of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(1):96–100.
216. McDade JE, Newhouse VF. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:287–309.
217. Labruna MB, Ogrzewalska M, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Moraes-filho J, et al. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):829–34.
218. Ferraz KMPM de B, Ferraz SF de B, Moreira JR, Couto HTZ, Verdade LM. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis. *J Biogeogr.* 2007;34:223–30.
219. Polo G, Labruna MB, Ferreira F. Satellite hyperspectral imagery to support tick-borne infectious diseases surveillance. *PLoS One.* 2015;10(11):e0143736.
220. Rudorff BFT, de Aguiar DA, da Silva WF, Sugawara LM, Adami M, Moreira MA. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo State (Brazil) using landsat data. *Remote Sens.* 2010;2(4):1057–76.
221. Felix GA, Almeida Paz ICL, Piovezan U, G GR, Lima KAO, Nääs IA, et al. Feeding behavior and crop damage caused by capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in an agricultural landscape. *Brazilian J Biol.* 2014;74(4):779–86.
222. Souza CE De, Pinter A, Donalisio MR. Risk factors associated with the transmission of Brazilian spotted fever in the Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(1):11–7.

223. Guglielmone AA, Estrada-peña A, Mangold AJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Martins JR, et al. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Vet Parasitol.* 2003;113:273–88.
224. de Lemos ERS, Machado RD, Coura JR, Guimarães MAA, Freire NMS. Infestation by ticks and detection of antibodies to spotted fever group Rickettsiae in wild animals captured in the State of São Paulo, Brazil. A preliminary report. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91(6):701–2.
225. Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MCB, Gennari SM, Galvão MAM, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group Rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the State of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fe. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(1):93–7.
226. Sangioni LA, Horta MC, Vinna MCB, Gennari SM, Soares RM, Galvão MAM, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):265–70.
227. Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CVB, Figueira FCB, Labruna MB, et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica.* 2006;22(3):495–501.
228. Freitas MCD de O, Grycajuk M, Molento MB, Bonacin J, Labruna MB, Pacheco R de C, et al. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(2):130–1.
229. Souza CE, Camargo LB, Pinter A, Donalisio MR. High seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian spotted fever. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153303.
230. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8th ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. 448 p.
231. Acosta IDACL, Costa APDA, Gennari SM, Marcili A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in wild and domestic animals in an Atlantic Rainforest Fragment and surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil. *J Med Entomol.* 2014;51(3):686–93.
232. Cuba CAC. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(2):207–20.
233. Jenkins EJ, Simon A, Bachand N, Stephen C. Wildlife parasites in a One Health world. *Trends Parasitol.* 2015;31(5):174–80.
234. Polley L. Navigating parasite webs and parasite flow: Emerging and re-emerging parasitic zoonoses of wildlife origin. *Int J Parasitol.* 2005;35:1279–94.
235. Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol.* 1993;30(2):426–35.
236. Cardoso RM, de Araújo NNSL, Romero GAS, Souza TTCM, Dietrich AG, Mendes JD, et al.

- Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasit Vectors*. 2015;8:171.
237. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Unidade Monitoramento por Satélite. Inventário e caracterização da fauna de vertebrados selvagens de Campinas [Internet]. [acesso em 22 de novembro de 2013]. Disponível em: <http://www.faunacps.cnpm.embrapa.br>
238. Roskov Y, Abucay L, Orrell T, Nicolson D, Kunze T, Culham A, et al., editors. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2015 Annual Checklist [Internet]. Leiden: Species 2000; 2015. Disponível em: www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2015
239. Sikes RS, Gannon WL, American TAC and UC of TAS of M. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal*. 2011;92(1):235–53.
240. Furtado MM, Nunes AL V, Intelizano TR, Teixeira RHF, Cortopassi SRG. Comparison of racemic ketamine versus (S +) ketamine when combined with midazolam for anesthesia of *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*. *J Zoo Wildl Med*. 2010;41(3):389–94.
241. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):560–3.
242. Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP, editors. Mamíferos do Brasil. Londrina: UEL; 2006. 439 p.
243. Ferreira EC, Gontijo CM, Cruz I, Melo MN, Silva AM. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):895–8.
244. Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, Kiugu S, et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80(4):583–36.
245. Garcez LM, Silveira FT, el Harith A, Lainson R, Shaw JJ. Experimental cutaneous leishmaniasis. IV. The humoral response of *Cebus apella* (Primates: Cebidae) to infections of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (Viannia) lainsoni* and *L. (V.) braziliensis* using the direct agglutinat. *Acta Trop*. 1997;68(1):65–76.
246. el Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönián G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(5):575–9.
247. Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors*. 2014;7:501.
248. Silva RC, Richini-pereira VB, Kikuti M, Marson PM, Langoni H. Detection of *Leishmania* (*L.*) *infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers with sensitive species-specific primers. *Vet Q*. 2017;37(1):23–30.

249. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*. 2010;137(8):1159–68.
250. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):2294–7.
251. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33(3):205–14.
252. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop*. 1999;72(2):203–12.
253. Moser DR, Kirchhoff L V, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27(7):1477–82.
254. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(5):574–82.
255. Labruna MB, McBride JW, Bouyer DH, Camargo LM, Camargo EP, Walker DH. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *J Med Entomol*. 2004;41(3):533–7.
256. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):90–8.
257. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two *Rickettsial* genes. *J Bacteriol*. 1991;173(5):1576–89.
258. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28(10):2731–9.
259. Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Br J Biomed Sci*. 2001;58(2):85–91.
260. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*. 2008;24(8):371–7.
261. Hernández L, Montoya A, Checa R, Dado D, Gálvez R, Otranto D, et al. Course of experimental infection of canine leishmaniosis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet Parasitol*. 2015;207(1–2):149–55.
262. Polley L, Thompson A. Parasites and wildlife in a changing world. *Trends Parasitol*. 2015;31(4):123–4.

263. Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res.* 2012;110(3):1065–78.
264. Lima BS, Dantas-Torres F, de Carvalho MR, Marinho-Junior JF, de Almeida EL, Brito MEF, et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(9):592–7.
265. Rosypal AC, Alexander A, Byrd D, Weaver M, Stewart R, Gerhold R, et al. Survey of antibodies to *Leishmania* spp. in wild canids from Pennsylvania and Tennessee. *J Zoo Wildl Med.* 2013;44(4):1131–3.
266. Babuadze G, Alvar J, Argaw D, de Koning HP, Iosava M, Kekelidze M, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(3):e2725.
267. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol.* 2014;202(3–4):296–300.
268. Johnson I, Spence MTZ, editors. The Molecular Probes® Handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies [Internet]. 11th ed. Life Technologies; 2010. 1060 p. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/tables/binding-profiles-of-protein-a-and-protein-g.html>
269. Sousa S, Lopes AP, Cardoso L, Silvestre R, Schallig H, Reed SG, et al. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Trop.* 2011;120(1–2):82–7.
270. de Korte PM, Harith AE, Dereure J, Huigen E, Faucherre V, van der Kaay HJ. Introduction of an improved direct agglutination test for the detection of *Leishmania infantum* infection in southern France. *Parasitol Res.* 1990;76(6):526–30.
271. Semião-Santos SJ, el Harith A, Ferreira E, Pires CA, Sousa C, Gusmão R. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res.* 1995;81(3):235–9.
272. Mahmoudvand H, Mohebbali M, Sharifi I, Keshavarz H, Hajjaran H, Akhoundi B, et al. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Baft District, Kerman Province, Southeast of Iran. *Iran J Parasitol.* 2011;6(1):1–11.
273. Silva ES, Schoone GJ, Gontijo CMF, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HDFH. Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2005;4:4.
274. Sundar S, Singh RK, Maurya R, Kumar B, Chhabra A, Singh V, et al. Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(6):533–7.
275. Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetich S, O'keeffe C, Davidson RN. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(1):76–80.
276. Rajasekariah G-HR, Cardoso L, Dogcio DA, Martin SK, Smithyman AM. A novel exo-antigen-based

- ELISA for the detection of canine leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(4):616–23.
277. Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, et al. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int J Parasitol.* 2008;38(6):617–22.
278. Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J, Davidson R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. *Trop Med Int Health.* 2003;8(2):164–7.
279. el Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E, et al. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J Clin Microbiol.* 1989;27(10):2252–7.
280. Mohebbali M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, et al. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol.* 2005;129(3–4):243–51.
281. Sharifdini M, Mohebbali M, Keshavarz H, Hosseinienejad M, Hajjarian H, Akhoundi B, et al. *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in domestic dogs (*Canis familiaris*) in Meshkin-Shahr District, Northwestern Iran. *Iran J Arthropod Borne Dis.* 2011;5(2):60–8.
282. Voltarelli E, Arraes S, Perles TF, Lonardon M, Teodoro U, Silveira T. Serological survey for *Leishmania* sp. infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2009;15(4):732–44.
283. Schallig HDFH, da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(3):387–93.
284. Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol.* 2001;99(2):105–11.
285. Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem.* 2005;40:219–59.
286. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-Time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):1897–900.
287. Mohammadiha A, Haghighi A, Mohebbali M, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Canine visceral leishmaniasis: a comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol.* 2013;192(1–3):83–90.
288. Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghighi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Exp Parasitol.* 2013 Jan;133(1):89–94.
289. Babiker ZOE, Davidson R, Mazinda C, Kipnetich S, Ritmeijer K. Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(4):689–93.
290. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Zooprofilattico I, et al. Detection of *Leishmania*

- infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbiol. 1999;37(9):2931–5.
291. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(5):951–8.
 292. Arana M, Evans DA, Zolessi A, Cuentas AL, Arevalo J. Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84(4):526–9.
 293. Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 2004;90(1):31–7.
 294. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet J, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main New World *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. J Clin Microbiol. 2006;44(2):459–67.
 295. Zampieri RA, Laranjeira-silva MF, Muxel SM, Lima CS De, Shaw JJ, Floeter-winter LM. High resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of *Leishmania* species. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004495.
 296. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönián G, Töz SÖ, Jaffe CL, et al. Detection and identification of Old World *Leishmania* by high resolution melt analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(1):e581.
 297. Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(6):962–5.
 298. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(5):e2205.
 299. CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Febre Maculosa [Internet]. Casos confirmados autóctones de FMB no estado de São Paulo por município de LPI SP e ano de início dos sintomas. 2016 [acesso em 20 de junho de 2017]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/fmaculosa/fmb0717_lpi.pdf
 300. Keysary A, King R, Inbar M, Shanas U, Leitner M, Din AB, et al. Spotted fever group Rickettsiae in ticks collected from wild animals in Israel. Am J Trop Med Hyg. 2011;85(5):919–23.
 301. Melo ALT, Aguiar DM de, Spolidorio MG, Yoshinari NH, Matushima ER, Labruna MB, et al. Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis spp.*) in the state of São Paulo, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2016;25(3):348–52.
 302. Silveira I, Martins TF, Olegário MM, Peterka C, Guedes E, Ferreira F, et al. Rickettsial infection in animals, humans and ticks in Paulicéia, Brazil. Zoonoses Public Health. 2015;62(7):525–33.

303. Szabó MP, Nieri-Bastos FA, Spolidorio MG, Martins TF, Barbieri AM, Labruna MB. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. *Parasitology*. 2013;140(6):719–28.
304. Coelho MG, Ramos V do N, Limongi JE, de Lemos ERS, Guterres A, da Costa Neto SF, et al. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(3):275–82.
305. Binder L de C, Krawczak F da S, Sponchiado J, Melo GL, Moraes-Filho J, Bastos FAN, et al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in small mammals from Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Cienc Rural*. 2017;47(1):e20160476.
306. Krawczak FS, Binder LC, Oliveira CS, Costa FB, Moraes-Filho J, Martins TF, et al. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. *Exp Appl Acarol*. 2016;70(2):219–29.
307. Horta MC, Moraes-Filho J, Casagrande RA, Saito TB, Rosa SC, Ogrzewalska M, et al. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009;9(1):109–18.
308. Tay ST, Rohani MY, Ho TM, Devi S. Isolation and PCR detection of *Rickettsiae* from clinical and rodent samples in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33(4):772–9.
309. Barandika JF, Hurtado A, García-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in Northern Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:6166–71.
310. Castellaw AH, Cheney EF, Varela-Stokes AS. Tick-borne disease agents in various wildlife from Mississippi. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(4):439–42.
311. Lledó L, Domínguez-Peñafiel G, Giménez-Pardo C, Gegúndez I, González R, Saz JV. Molecular and serological study of *Rickettsial* infection in humans, and in wild and farm animals, in the Province of Burgos, Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2014;14(6):383–8.
312. Lopes L de B, Guterres A, Rozental T, Carvalho de Oliveira R, Mares-Guia MA, Fernandes J, et al. *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*. 2014;7(1):191.
313. Elfving K, Malmsten J, Dalin A-M, Nilsson K. Serologic and molecular prevalence of *Rickettsia helvetica* and *Anaplasma phagocytophilum* in wild cervids and domestic mammals in the central parts of Sweden. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2015;15(9):529–34.
314. Soares HS, Barbieri ARM, Martins TF, Minervino AHH, de Lima JTR, Marcili A, et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Exp Appl Acarol*. 2015;65(1):125–40.
315. Zhang JZ, Fan MY, Bi DZ. Detection of spotted fever group rickettsiae in ticks and rodents by polymerase chain reaction technique in People's Republic of China. *Acta Virol*. 1995;39(5–6):263–7.
316. Adjemian JZ, Adjemian MK, Foley P, Chomel BB, Kasten RW, Foley JE. Evidence of multiple zoonotic agents in a wild rodent community in the Eastern Sierra Nevada. *J Wildl Dis*. 2008;44(3):737–42.

317. Schex S, Dobler G, Riehm J, Müller J, Essbauer S. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2011;11(5):493–502.
318. Ndeereh D, Thaiyah A, Muchemi G, Miyunga AA. Molecular surveillance of spotted fever group rickettsioses in wildlife and detection of *Rickettsia sibirica* in a Topi (*Damaliscus lunatus* ssp. jimela) in Kenya. Onderstepoort J Vet Res. 2017;84(1):e1–7.
319. Piranda EM, Faccini JLH, Pinter A, Saito TB, Pacheco RC, Hagiwara MK, et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(7):696–701.
320. Souza CE, Moraes-filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SSL, et al. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. Vet Parasitol. 2009;161:116–21.
321. Bermúdez SE, Gottdenker N, Krishnavajhala A, Fox A, Wilder HK, González K, et al. Synanthropic mammals as potential hosts of tick-borne pathogens in Panama. PLoS One. 2017;12(1):e0169047.
322. Milagres BS, Padilha AF, Barcelos RM, Gomes GG, Montandon CE, Pena DC, et al. *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern region of Minas Gerais, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(6):1305–7.
323. Carranza-Tamayo CO, Werneck GL, Romero GAS. Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? Brazilian J Infect Dis. 2016;20(2):119–26.
324. Sherlock ÍA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Júnior G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani*, in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(4):511–511.
325. Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91(6):671–83.
326. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, De Carrasquilla CF, Young DG, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1989;40(5):480–6.
327. Travi BL, Osorio Y, Becerra MT, Adler GH. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998;92(3):275–8.
328. Carlos J, Carreira A, Valéria A, Pereira DDP. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia : Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. Parasit Vectors. 2012;5:111.
329. Marsden PD, Cuba CC, Vexenat A, Costa e Silva M, Costa e Silva A, Barreto AC. Experimental *Leishmania chagasi* infections in the marmoset *Callithrix jacchus jacchus*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981;75(2):314–5.
330. Dietze R, Araújo RC, Lima MLR, Vexenat JA, Marsden PD, Barreto AC. Ensaio terapêutico com glucantime em sagüis (*Callithrix jacchus*) infectados com uma cepa de *Leishmania donovani* aparentemente

- resistente ao tratamento. Rev Soc Bras Med Trop. 1985;18(1):39–42.
331. Pereira LH, Melo AL, Mayrink W, De Resende DM. A marmoset model for some New World dermatotropic leishmanias. Parassitologia. 1988;30(2–3):187–96.
332. Cuba CAC, Ferreira V, Bampi M, Magalhães A, Marsden PD, Vexenat A, et al. Experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the marmoset, *Callithrix penicillata* (Primates: Callithricidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990;85(4):459–67.
333. Vexenat A, Rosa C, Cuba CC, Marsden PD. Recovery of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from hepatic aspirates of the black-plumed marmoset, *Callithrix penicillata*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991;85(5):596.
334. Cuba-Cuba CA, Marsden PD. Failure to develop homologous immunity to a second challenge with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the black-plumed marmoset (*Callithrix penicillata*). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86(1):37.
335. Cuba-Cuba CA, Marsden PD. Marmosets in New World leishmaniasis research. Med (Buenos Aires). 1993;53(5):419–23.
336. Carneiro LA, Laurenti MD, Campos MB, Gomes CM de C, Corbett CEP, Silveira FT. Susceptibility of peritoneal macrophage from different species of neotropical primates to Ex vivo *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012;54(2):95–102.
337. Paiz LM, Fornazari F, Menozzi BD, Oliveira GC, Coiro CJ, Teixeira CR, et al. Serological evidence of infection by *Leishmania (Leishmania) infantum* (synonym: *Leishmania (Leishmania) chagasi*) in free-ranging wild mammals in a nonendemic region of the State of São Paulo, Brazil. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2015;15(11):667–73.
338. Bueno MG. Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação in situ e ex situ [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada.; 2012.
339. Travi BL, Arteaga LT, Leon AP, Adler GH. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(6):887–92.
340. Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Valéria A, et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. Rev do Inst Med Trop São Paulo. 2003;45(2):79–83.
341. FUNASA. Fundação Nacional da Saúde. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. In: Boletim eletrônico epidemiológico ano 02, nº 6. 2002. p. 10.
342. Barroso PA, Marco JD, Locatelli FM, Cardozo RM, Hoyos CL, Mora MC, et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: possible reservoirs and vectors. Am J Trop Med Hyg.

2015;93(2):334–9.

343. Werneck GL. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? Cad Saude Publica. 2016;32(6):eED010616.

344. von Zuben APB, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. Cad Saude Publica. 2016;32(6):1–11.

345. Werneck GL. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2010;26(4):644–5.

346. De Mendonça IL, Batista JF, Werneck GL, Soares MRA, Costa DL, Costa CHN. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(4):483–8.

347. Nunes CM, Lima VMF de, Melo GD de, Paula HB de, Pereira MEG, Tronco C de MT, et al. Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. Rev Bras Parasitol Vet. 2015;24(4):402–9.

348. Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis. 2002;186(9):1314–20.

349. Nunes CM, Lima VMF de, Paula HB de, Perri SHV, Andrade AM de, Dias FEF, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. Vet Parasitol. 2008;153(1–2):19–23.

350. Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(5):594–5.

351. Millán J, Ferroglío E, Solano-gallego L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. Parasitol Res. 2014;113(6):2005–14.

352. Curi NH de A, Paschoal AM de O, Massara RL, Marcelino AP, Ribeiro AA, Passamani M, et al. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around Atlantic Forest fragments. PLoS One. 2014;9(8):e1040003.

353. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. Adv Parasitol. 2004;57:1–88.

354. Regina-Silva S, Feres AMLT, França-Silva JC, Dias ES, Michalsky ÉM, de Andrade HM, et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec[®] vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. Vaccine. 2016;34(19):2233–9.

355. Grimaldi GJ, Teva A, dos-Santos CB, Santos FN, Pinto I de-S, Fux B, et al. Field trial of efficacy of the Leish-tec[®] vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. PLoS One. 2017;12(9):e0185438.

356. Otranto D, Dantas-torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends Parasitol. 2013;29(7):339–45.

357. Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med Int Heal. 2001;6(11):849–54.

358. Abad-Franch F, Diotaiuti L, Gurgel-Gonçalves R, Gürtler RE. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(2):251–4.
359. Ramos Jr. AN, Carvalho DM de. Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas. Cad Saude Publica. 2001;17(6):1403–12.
360. da Silva RA, Mercado VTC, Barbosa GL, Cortiço VL, Rodrigues C, Wanderley DMV. Situação atual da vigilância entomológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo. BEPA Bol Epidemiológico Paul. 2011;8(87):4–13.
361. Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, et al. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(4):443–9.
362. Almeida CE, Faucher L, Lavina M, Costa J, Harry M. Molecular individual-based A approach on *Triatoma brasiliensis*: inferences on triatomine foci, *Trypanosoma cruzi* natural infection prevalence, parasite diversity and feeding sources. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):1–19.
363. Lilio M, Folly-Ramos E, Rocha FL, Rabinovich J, Capdevielle-Dulac C, Harry M, et al. High *Triatoma brasiliensis* densities and *Trypanosoma cruzi* prevalence in domestic and peridomestic habitats in the State of Rio Grande do Norte, Brazil: The source for Chagas disease outbreaks? Am J Trop Med Hyg. 2017;96(6):1456–9.
364. Bhattacharyya T, Mills EA, Jansen AM, Miles MA. Prospects for *T. cruzi* lineage-specific serological surveillance of wild mammals. Acta Trop. 2015;151:182–6.
365. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(Suppl. I):31–40.
366. Lucheis SB, Da Silva A V., Araújo Jr JP, Langoni H, Meira DA, Marcondes-Machado J. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals with chronic Chagas' disease living in Botucatu town and surrounding region, São Paulo State, Brazil. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2005;11(4):492–509.
367. Bolzoni L, De Leo GA. Unexpected consequences of culling on the eradication of wildlife diseases: the role of virulence evolution. Am Nat. 2013;181(3):301–13.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Autorizações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para execução do projeto de pesquisa.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo" (protocolo nº 3296-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Rita Donalísio Cordeiro / Laís Moraes Paiz, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de março de 2014.

Campinas, 12 de março de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Infecção por *Leishmania chagasi* em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **3296-1**), de responsabilidade da **de Profa. Dra. Maria Rita Donalísio Cordeiro / Laís Moraes Paiz**, teve incluída duas novas etapas (abaixo explicitadas), tendo em vista a transferência da aluna para o programa de doutorado direto, com o projeto agora intitulado **“Pesquisa de infecção por agentes das leishmanioses, tripanossomíase americana e febre maculosa brasileira em mamíferos silvestres de vida livre de área de proteção ambiental do município de Campinas, São Paulo”** e que se trata apenas de inclusão de técnicas laboratoriais em material já coletado.

1. O projeto de pesquisa inicial propôs a coleta de sangue (com e sem anticoagulante) de mamíferos silvestres capturados. Contudo, conforme adendo solicitado, e aprovado pela CEUA-UNICAMP em novembro de 2014, foram colhidas amostras biológicas adicionais de fragmento de pele e/ou lesão de pele, com autorização do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (SISBIO nº 42926-1 e 42926-2). A análise dessas amostras não estava inclusa no projeto executado durante o mestrado e pretende-se realizá-la agora como parte da ampliação do projeto de pesquisa proposto para a transferência da aluna Laís Moraes Paiz do programa de Mestrado para o programa de doutoramento direto. Esta análise contempla a realização da técnica de **reação em cadeia da polimerase nas amostras de pele colhidas previamente (PCR)**, que estão armazenadas em temperatura de congelamento. A técnica visa à detecção de DNA de *Leishmania* nas amostras de pele íntegra e/ou lesão colhidas de 66/82 mamíferos capturados e amostrados e irá contribuir com os resultados já obtidos com os exames realizados em amostras sanguíneas;
2. Além da investigação de leishmaniose, tendo em vista que o material biológico já colhido dos 82 mamíferos silvestres capturados está devidamente armazenado, com alíquota suficiente para execução de mais alguns testes que exigem pouca quantidade de material, **será analisada a ocorrência de infecções por *Trypanosoma cruzi*, o agente causal da doença de Chagas, e por febre maculosa brasileira (*Rickettsia* spp.).** Para tal, as **técnicas de PCR e de Imunofluorescência Indireta** em sangue para detecção, respectivamente, dos agentes infecciosos e de anticorpos contra eles serão realizadas. Tais análises poderão contribuir com a vigilância epidemiológica dessas importantes enfermidades, tendo em vista que são zoonoses, e que pouco se sabe sobre o papel de mamíferos silvestres na transmissão dessas enfermidades.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 12/03/2014.

Prof. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Campinas, 15 de março de 2016.

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

ANEXO 2: Autorizações do Ministério do Meio Ambiente, por meio do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-1	Data da Emissão: 22/04/2014 15:33	Data para Revalidação*: 22/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento Bibliográfico	03/2014	12/2015
2	Mestrado em Saúde Coletiva, área de concentração de Epidemiologia.	03/2014	03/2016
3	Capturas e coletas de sangue dos mamíferos silvestres	05/2014	05/2015
4	Realização de extração de DNA e PCR	04/2015	08/2015
5	Realização de sorologias (DAT e Kalazar-Detect)	04/2015	08/2015
6	Análise dos Resultados	07/2015	12/2015
7	Redação da dissertação e artigos	07/2015	12/2015
8	Qualificação de mestrado (dentro do período)	10/2015	11/2015
9	Defesa da dissertação de mestrado (dentro do período)	02/2016	02/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As armadilhas utilizadas para a captura de vertebrados deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (pela manhã e tarde) para minimizar a morte devido a hipo ou hipertermia.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Maria Rita Donalísio Cordeiro	Orientadora	025.066.638-35	7608638 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18842958





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-1	Data da Emissão: 22/04/2014 15:33	Data para Revalidação*: 22/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPINAS	SP	Área de Proteção Ambiental Municipal de Campinas	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Eira barbara, Dasyprocta azarae, Procyon cancrivorus, Galictis cuja, Alouatta fusca, Callithrix jacchus, Lontra longicaudis, Agouti paca, Sciurus aestuans, Didelphis albiventris, Cavia aperea, Euphractus sexcinctus, Philander opossum, Callicebus personatus, Caluromys philander, Cerdocyon thous, Sphiggurus villosus, Puma yagouaroundi, Leopardus tigrinus, Nasua nasua, Didelphis aurita, Lycalopex vetulus, Cebus apella, Dasypus novemcinctus, Leopardus wiedii, Lepus europaeus, Puma concolor, Myocastor coypus, Hydrochaeris hydrochaeris, Leopardus pardalis, Sylvilagus brasiliensis
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Didelphis aurita, Lycalopex vetulus, Nasua nasua, Lepus europaeus, Hydrochaeris hydrochaeris, Callithrix jacchus, Leopardus pardalis, Callicebus personatus, Caluromys philander, Euphractus sexcinctus, Cavia aperea, Alouatta fusca, Lontra longicaudis, Dasypus novemcinctus, Didelphis albiventris, Agouti paca, Cerdocyon thous, Sphiggurus villosus, Sciurus aestuans, Eira barbara, Dasyprocta azarae, Sylvilagus brasiliensis, Procyon cancrivorus, Myocastor coypus, Galictis cuja, Cebus apella, Puma concolor, Puma yagouaroundi, Leopardus wiedii, Leopardus tigrinus, Philander opossum
3	Marcação de animais silvestres in situ	Dasyprocta azarae, Sphiggurus villosus, Sylvilagus brasiliensis, Alouatta fusca, Callithrix jacchus, Caluromys philander, Euphractus sexcinctus, Cerdocyon thous, Puma yagouaroundi, Procyon cancrivorus, Hydrochaeris hydrochaeris, Leopardus tigrinus, Lepus europaeus, Nasua nasua, Leopardus wiedii, Sciurus aestuans, Didelphis albiventris, Cebus apella, Cavia aperea, Myocastor coypus, Galictis cuja, Lontra longicaudis, Lycalopex vetulus, Puma concolor, Didelphis aurita, Dasypus novemcinctus, Philander opossum, Agouti paca, Leopardus pardalis, Callicebus personatus, Eira barbara

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Sangue
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue
3	Amostras biológicas (Prímatas)	Sangue
4	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
5	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
6	Método de captura/coleta (Prímatas)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
7	Método de marcação (Carnívoros)	Microchip
8	Método de marcação (Outros mamíferos)	Microchip
9	Método de marcação (Prímatas)	Microchip

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Estadual de Campinas	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18842958



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-1	Data da Emissão: 22/04/2014 15:33	Data para Revalidação*: 22/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18842958



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-1	Data da Emissão: 22/04/2014 15:33	Data para Revalidação*: 22/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : Universidade Estadual de Campinas	CNPJ: 46.068.425/0001-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 18842958



Página 4/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-2	Data da Emissão: 07/11/2014 12:58	Data para Revalidação*: 07/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Levantamento Bibliográfico	03/2014	12/2015
2	Mestrado em Saúde Coletiva, área de concentração de Epidemiologia.	03/2014	03/2016
3	Capturas e colheitas de sangue dos mamíferos silvestres	05/2014	05/2015
4	Realização de extração de DNA e PCR	04/2015	08/2015
5	Realização de sorologias (DAT e Kalazar-Detect)	04/2015	08/2015
6	Análise dos Resultados	07/2015	12/2015
7	Redação da dissertação e artigos	07/2015	12/2015
8	Qualificação de mestrado (dentro do período)	10/2015	11/2015
9	Defesa da dissertação de mestrado (dentro do período)	02/2016	02/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As armadilhas utilizadas para a captura de vertebrados deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (pela manhã e tarde) para minimizar a morte devido a hipotermia ou hipertermia.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Maria Rita Donalizio Cordeiro	Orientadora	025.066.638-35	7608638 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66333238



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-2	Data da Emissão: 07/11/2014 12:58	Data para Revalidação*: 07/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPINAS	SP	Área de Proteção Ambiental Municipal de Campinas	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Eira barbara, Dasyprocta azarae, Procyon cancrivorus, Galictis cuja, Alouatta fusca, Callithrix jacchus, Lontra longicaudis, Agouti paca, Sciurus aestuans, Didelphis albiventris, Cavia aperea, Euphractus sexcinctus, Philander opossum, Callicebus personatus, Caluromys philander, Cerdocyon thous, Sphiggurus villosus, Puma yagouaroundi, Leopardus tigrinus, Nasua nasua, Didelphis aurita, Lycalopex vetulus, Cebus apella, Dasypus novemcinctus, Leopardus wiedii, Lepus europaeus, Puma concolor, Myocastor coypus, Hydrochaeris hydrochaeris, Leopardus pardalis, Sylvilagus brasiliensis
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Didelphis aurita, Lycalopex vetulus, Nasua nasua, Lepus europaeus, Hydrochaeris hydrochaeris, Callithrix jacchus, Leopardus pardalis, Callicebus personatus, Caluromys philander, Euphractus sexcinctus, Cavia aperea, Alouatta fusca, Lontra longicaudis, Dasypus novemcinctus, Didelphis albiventris, Agouti paca, Cerdocyon thous, Sphiggurus villosus, Sciurus aestuans, Eira barbara, Dasyprocta azarae, Sylvilagus brasiliensis, Procyon cancrivorus, Myocastor coypus, Galictis cuja, Cebus apella, Puma concolor, Puma yagouaroundi, Leopardus wiedii, Leopardus tigrinus, Philander opossum
3	Marcação de animais silvestres in situ	Dasyprocta azarae, Sphiggurus villosus, Sylvilagus brasiliensis, Alouatta fusca, Callithrix jacchus, Caluromys philander, Euphractus sexcinctus, Cerdocyon thous, Puma yagouaroundi, Procyon cancrivorus, Hydrochaeris hydrochaeris, Leopardus tigrinus, Lepus europaeus, Nasua nasua, Leopardus wiedii, Sciurus aestuans, Didelphis albiventris, Cebus apella, Cavia aperea, Myocastor coypus, Galictis cuja, Lontra longicaudis, Lycalopex vetulus, Puma concolor, Didelphis aurita, Dasypus novemcinctus, Philander opossum, Agouti paca, Leopardus pardalis, Callicebus personatus, Eira barbara

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Sangue, Outras amostras biológicas(Pele), Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Outras amostras biológicas(Pele)
3	Amostras biológicas (Primatas)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Outras amostras biológicas(Pele), Sangue
4	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
5	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
6	Método de captura/coleta (Primatas)	Puçá, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")
7	Método de marcação (Carnívoros)	Microchip
8	Método de marcação (Outros mamíferos)	Microchip
9	Método de marcação (Primatas)	Microchip

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66333238



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-2	Data da Emissão: 07/11/2014 12:58	Data para Revalidação*: 07/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66333238



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42926-2	Data da Emissão: 07/11/2014 12:58	Data para Revalidação*: 07/12/2015
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lais Moraes Paiz	CPF: 030.493.261-23
Título do Projeto: Infecção por Leishmania chagasi em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	CNPJ: 46.068.425/0001-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 66333238



Página 4/4

ANEXO 3: Autorização da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Campinas, São Paulo, para participação no projeto de pesquisa.



PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINAS
Secretaria Municipal de Saúde



AUTORIZAÇÃO

019/2014

Autorizo a realização da Pesquisa intitulada “**Infecção por *Leishmania chagasi* em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo**”, que tem por objetivo avaliar a presença de infecções por *Leishmania chagasi* em mamíferos de vida livre da Área de Proteção Ambiental (APA) do município de Campinas, subdistritos de Sousas e Joaquim Egídio, estado de São Paulo, região onde foi detectado o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina (LVC) do município.

Declaro estar ciente que a Pesquisa (Aprovada no Comitê de Ética em Uso de Animais da Unicamp – protocolo 3296-1) será desenvolvida por estudante do Curso de Pós Graduação – Nível Mestrado, no Departamento de Saúde Coletiva da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, em mamíferos silvestres de vida livre da APA nos subdistritos de Sousas e Joaquim Egídio, com apoio da equipe de Vigilância Epidemiológica do Departamento de Vigilância em Saúde - DEVISA, sob a orientação da Professora Doutora Maria Rita Donalísio Cordeiro.

Campinas, 15 de maio de 2014


Cármino Antonio de Souza
Secretário Municipal de Saúde

ANEXO 4: Declaração das editoras *Mary Ann Liebert* e PLOS que permite, respectivamente, a inclusão dos artigos publicados nos periódicos *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* e PLOS *Neglected Tropical Diseases* nesta tese, sem que os direitos autorais sejam infringidos.



Lais Moraes <laismoraesp@gmail.com>

Reprints & Permissions

Ballen, Karen <KBallen@liebertpub.com>
 Para: "Lais M. Paiz" <laismoraesp@gmail.com>

20 de outubro de 2017 12:58

Dear Lais:

Copyright permission is granted for this request to include your article in your thesis, as long as it is not for commercial purposes.

Kind regards,

Karen Ballen

Manager

From: Lais M. Paiz [mailto:laismoraesp@gmail.com]
Sent: Thursday, October 19, 2017 3:08 PM
To: Ballen, Karen <KBallen@liebertpub.com>
Subject: Reprints & Permissions

[Texto das mensagens anteriores oculto]



Lais Moraes <laismoraesp@gmail.com>

Re: Reprints & Permissions [ref:_00DU0Ifis._5000Bf0uST:ref]

PLOS Neglected Tropical Diseases <plosntds@plos.org>
 Para: "laismoraesp@gmail.com" <laismoraesp@gmail.com>

19 de outubro de 2017 19:54

Dear Miss Paiz,

Thank you for your email. PLOS applies the Creative Commons Attribution (CC-BY) license to all of our articles: <http://journals.plos.org/plosntds/s/content-license>

Under the CC BY license, authors retain ownership of the copyright for their article, but allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles in PLOS journals, as long as the original authors and the source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

Please don't hesitate to contact us if you have any further queries.

All best,
 Charlotte

PLOS | OPEN FOR DISCOVERY
 Charlotte Bhaskar | Publications Manager, PLOS Neglected Tropical Diseases
 1160 Battery Street, Suite 225, San Francisco, CA 94111
plosntds@plos.org

Case Number: 05472433

10. APÊNDICES

APÊNDICE 1: Artigo “Infection by *Leishmania* spp. in free-ranging opossums (*Didelphis albiventris*) in an environmentally protected area inhabited by humans in Southeastern Brazil”.

VECTOR-BORNE AND ZOO NOTIC DISEASES
Volume 16, Number 11, 2016
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/vbz.2016.2001

SHORT COMMUNICATIONS

Infection by *Leishmania* spp. in Free-Ranging Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Environmentally Protected Area Inhabited by Humans in Southeastern Brazil

Laís Moraes Paiz,¹ Maria Rita Donalizio,¹ Virgínia Bodelão Richini-Pereira,² Gabriela Motoie,³ Claudio Luiz Castagna,⁴ and José Eduardo Tolezano³

Abstract

There is a growing concern about the participation of wild hosts and reservoirs in the epidemiology of leishmaniasis, particularly within the context of increasingly frequent environmental changes and the expansion of the One Health concept. This work is a molecular research of infection by *Leishmania* spp. among the wildlife of an environmentally protected area located in the municipality of Campinas, São Paulo, Brazil. The studied area has a history of intense environmental changes, with notifications of human cases of cutaneous leishmaniasis in the 1990s, and a focus of canine visceral leishmaniasis since 2009. Eighty-two wild mammals were sampled by monthly captures in this region over a 1-year period. Blood samples were collected from each animal and subjected to DNA extraction and PCR using primers for the region of the internal transcribed spacer-1. The results of gene sequencing for the first time revealed the infection of opossums (*Didelphis albiventris*) by *Leishmania* spp., subgenera *Leishmania* and *Viannia*, in Campinas. These findings, in addition to environmental and historical characteristics of the studied area, indicate a possible role of wildlife in the introduction and/or maintenance of natural foci of leishmaniasis transmission.

Keywords: epidemiology, *Leishmania*, PCR, wildlife, zoonosis

Introduction

LEISHMANIASIS BECAME A GROWING public health concern in many countries around the world, since natural or anthropogenic environmental changes have increased the risk of this disease (WHO 2010). In Brazil, zoonotic transmission cycles commonly occur in areas where human dwellings are located close to the sylvatic transmission cycle of the parasite (WHO 2010).

Thus, discussions have increasingly focused on the participation of wildlife in leishmaniasis epidemiology, given that environmental changes can provide a greater degree of contact between these animals and humans and/or domestic animals. This is an important factor to be considered in leishmaniasis control programs, considering that a variety of mammal host species have been described infected by *Leishmania* in the Americas (Roque and Jansen 2014).

The municipality of Campinas, State of São Paulo, southeastern Brazil, has an environmentally protected area (EPA) containing Atlantic forest fragments, which has undergone severe environmental changes and urbanization. Outbreaks of human cutaneous leishmaniasis (CL) were reported in the 1990s (Corte et al. 1996) in this area, and currently, the sole focus of autochthonous transmission of visceral leishmaniasis (VL) in Campinas occurs in the EPA (Von Zuben et al. 2014). Based on these facts, we conducted an investigation of a possible cycle of transmission of *Leishmania* spp. among free-ranging wild mammals from this area.

Materials and Methods

Monthly captures of wild mammals were conducted between April 2014 and March 2015 at 18 points in the EPA of Campinas, located between the latitudes 22°45'00" and

¹Department of Public Health, School of Medical Sciences, State University of Campinas—UNICAMP, Campinas, Brazil.

²Bauru II Center of Regional Laboratories, Adolfo Lutz Institute, Bauru, Brazil.

³Center for Systemic Parasitic Diseases, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil.

⁴Surveillance Unit in Zoonosis, Campinas Municipal Health Secretariat, Campinas, Brazil.

PARASITEMIA BY PATHOGENIC *LEISHMANIA* SPP. IN OPOSSUMS

729

22°56'00" S and longitudes 46°52'30" and 47°00'00" W. Sixty tomahawk traps (30×21×20 cm and 55×20×20 cm) were used for three consecutive nights/month, baited with banana and chicken.

The captured mammals were identified with microchip implants (Microchips Brasil®, Brazil), and blood samples were collected by venipuncture. DNA extraction of total blood was performed within 48 h after the end of each capture, using a QIAamp DNA mini kit in the QIAcube® DNA extractor (Qiagen®, Netherlands).

PCR was performed using 1 µL of extracted DNA (10 ng) and 11 µL of PCR mix containing 1.3 µL buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4), 0.4 µL MgCl₂ (1.6 µM), 0.25 µL of each oligonucleotide (0.2 µM), 0.25 µL dNTP (0.2 mM), 0.25 µL of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil), and 8.3 µL of ultrapure water.

To evaluate the endogenous quality, DNA integrity, and presence of inhibitors, we used primers for the conserved gene of the interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), IRBP-CF-FWD (5'-TCCAACACCACCACTGAG ATCTGGAC-3') and IRBP-CF-REV (5'-GTGAGGAAGA AATCGGACTGGCC-3') (Ferreira et al. 2010), or for β1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTACC-3') and β2 (5'-CTTCTGACACAACGTGTCTCACTAGC-3') (Lee et al. 2001).

For *Leishmania* spp. DNA research, we used primers for the internal transcribed spacer region-1 (ITS-1), LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') and L5.8S (5'-TGATA CCACTTATCGCACTT-3') (El Tai et al. 2000). As positive controls we used 10 ng of DNA extracted from an in vitro culture of *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN), and ultrapure water as negative control.

The amplified products were identified by agarose gel electrophoresis 1.5% containing 1.0 µL/10 mL of SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen®, Life Technologies) and purified with the Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare®, United Kingdom). Genetic sequencing by the Sanger method was performed in the Genetic Analyzer 3500 automated sequencer using the Big-Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems®, Life Technologies).

The sense and antisense sequences were visualized using Chromas v 2.1.1 software (Technelysium Pty Ltd., Australia), subjected to global alignment using MEGA5 software (Tamura et al. 2011) and compared with those sequences deposited in GenBank, using the nucleotide basic local alignment search tool (BLASTn, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

This research was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the State University of Campinas (No. 3296-1) and by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA), through the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO, No. 42926-1/2).

Results

Eighty-two wild mammals of six species were sampled, as follows: 1/82 (1.2%) *Mazama gouazoubira* (brocket deer), 1/82 (1.2%) *Sciurus (Guerlinguetus) aestuans* (squirrel), 8/82

(9.8%) *Callithrix jacchus* (white-tufted-ear marmoset), 11/82 (13.4%) *Didelphis aurita* (black-eared opossum), 18/82 (22.0%) *Callithrix penicillata* (black-tufted-ear marmoset), and 43/82 (52.4%) *Didelphis albiventris* (white-eared opossum). Six *D. albiventris* (6/82, 7.32%; 95% CI 1.68–12.95%) were sampled again in a second capture.

The molecular identities of amplicons obtained from samples of two *D. albiventris* (2/82, 2.4%, 95% CI 0.3–8.5%) were confirmed by genetic sequencing. The sequence of one amplicon (GenBank accession number KX580706) showed 100% similarity with sequences of *Leishmania (Leishmania) infantum* (query cover 100%; value E=2e-135, access KR081265.1 and others) deposited in GenBank, and the sequence of the other amplicon (GenBank accession number KX580707) showed 100% similarity with sequence of *Leishmania (Viannia) guyanensis* (query cover 100%; E value=5e-100, access FJ753388.1 and others) and 99% similarity with sequences of *L. (V.) peruviana* (query cover 100%; E value=2e-98; access HG512896.1 and others), *L. (V.) braziliensis* (query cover 100%; E value=2e-98, access FJ753382.1 and others), and *L. (V.) panamensis* (query cover=100%; E value=3e-97; access CP009396.1 and others). This is the first report of infection by *Leishmania* spp. in wild animals in the municipality of Campinas.

Discussion

In 1996, Corte et al. associated cases of human CL that occurred in the EPA of Campinas to environmental changes due to urban expansion in the 1970s and 1980s, suggesting the importance of identifying possible wild reservoirs involved. Also in this area, the finding of *Lutzomyia longipalpis* infected by *L. (L.) infantum* and the VL transmission among dogs, which has been restricted to this geographical region of the municipality since 2009 (Von Zuben et al. 2014), have aroused interest of local health institutions.

The species *D. albiventris* possibly acts as an *L. (L.) infantum* reservoir in Brazilian zoonotic VL, besides zoonotic CL and mucocutaneous leishmaniasis in Peru (WHO 2010). In Brazil, *L. (L.) infantum* was first isolated from this species in Bahia (Sherlock et al. 1984) and their infectivity to vectors was demonstrated by xenodiagnosis (Sherlock 1996).

The first report of free-ranging opossums with parasitemia by pathogenic species of *Leishmania* spp. in the EPA of Campinas, in addition to previous epidemiological data and the area's environmental and historical characteristics, indicates a possible role of wildlife in the introduction and/or maintenance of transmission cycles of causative agents of leishmaniasis.

Although genetic sequencing enabled the identification of the parasite only in two animals, the occurrence of *Leishmania* infection in wild species in the region was previously unknown. Furthermore, sequencing of one sample made it possible to confirm the presence of *L. (L.) infantum*, but in another sample a sequence was obtained that is common to sequences of different species from the subgenus *Viannia*. However, based on similarity and e values obtained, it is possible to infer that the *Leishmania* species detected in this blood sample is probably *L. (V.) guyanensis* (greater similarity and lower e value), whose circulation has never been reported in the study area.

730

PAIZ ET AL.

These findings are especially important from a public health perspective, considering that opossums are reservoirs of the parasite (WHO 2010) and that the EPA is inhabited by humans.

It must be noted, however, that *Leishmania* spp. may be transmitted not only from wildlife but also for those animals from infected pets or even from infected humans living in wild areas, if there is the presence of vectors.

The measures proposed by the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program have been insufficient to prevent the spread and to reduce the prevalence of the disease. The low effectiveness is probably due to several factors, but the main pillar of this program is the elimination of the canine reservoir (Roque and Jansen 2014). The results of this investigation suggest that eliminating dogs with positive serology may not be sufficient to prevent the maintenance and/or expansion of VL foci in places where there is involvement of infected wild reservoirs.

Conclusions

This work reports the circulation of pathogenic species of *Leishmania* spp. in wild animals considered reservoirs of the parasite (*Didelphis albiventris*) in an EPA inhabited by humans. The results suggest the need for periodic reviews and flexibility in leishmaniasis control and surveillance strategies, considering the specificities of each locality.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant nos. 2014/27212-0, 2014/13049-0 and 2016/02572-0, besides the financial support of the Research Program for the Unified Health System (PPSUS, FAPESP, CNPq—National Council for Scientific and Technological Development—No. 12/51267-4). The authors also thank the staff of the Surveillance Unit of Zoonosis of the Campinas Municipal Health Secretariat and of the Adolfo Lutz Institute for their technical and scientific support, especially in the fieldwork.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

Corte AA, Nozawa MR, Ferreira MC, Pignatti MG, et al. Eco-epidemiological aspects of American cutaneous leish-

maniasis in the Municipality of Campinas, São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública* 1996; 12:465–472.

El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *T Roy Soc Trop Med H* 2000; 94: 575–579.

Ferreira EC, Gontijo CM, Cruz I, Melo MN, et al. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105:895–898.

Lee CN, Cavanagh HM, LO ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Br J Biomed Sci* 2001; 58:85–91.

Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2014; 3:251–262.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 671–683.

Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi G, Jr. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia, Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79:511.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2731–2739.

Von Zuben APB, Angerami RN, Castagna C, Baldini MBD, et al. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47:385–388.

World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, Technical Report Series, No. 949, 2010:187pp.

Address correspondence to:

Maria Rita Donalisio
Departamento de Saúde Coletiva
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas
Rua Tessália Vieira de Camargo
126, Cidade Universitária
Campinas, CEP 13083-887, São Paulo
Brazil

E-mail: rita.donalisio@gmail.com

APÊNDICE 2: Artigo “Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases”.



RESEARCH ARTICLE

Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases

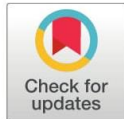
Maria Rita Donalisio¹*, Laís Moraes Paiz¹*, Vanessa Gusmon da Silva², Virgínia Bodelão Richini-Pereira³, Andrea Paula Bruno von Zuben⁴, Claudio Luiz Castagna⁴, Gabriela Motoie², Roberto Mitsuyoshi Hiramoto², José Eduardo Tolezano²

1 Department of Public Health, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil, **2** Center for Systemic Parasitic Diseases, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Bauru II Center of Regional Laboratories, Adolfo Lutz Institute, Bauru, São Paulo, Brazil, **4** Campinas Municipal Health Department, Campinas, São Paulo, Brazil

* These authors contributed equally to this work.

‡ APBvZ, CLC, GM, and RMH also contributed equally to this work.

* laismoraesp@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Donalisio MR, Paiz LM, da Silva VG, Richini-Pereira VB, von Zuben APB, Castagna CL, et al. (2017) Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases. PLoS Negl Trop Dis 11(7): e0005666. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005666>

Editor: Ricardo Toshio Fujiwara, Universidade Federal de Minas Gerais, BRAZIL

Received: January 9, 2017

Accepted: May 26, 2017

Published: July 13, 2017

Copyright: © 2017 Donalisio et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. The data of the *Leishmania* genetic sequences detected in wild animals are available from the GenBank database (accession numbers KX580706 and KX580707).

Funding: This research received financial support of São Paulo Research Foundation (FAPESP, <http://www.fapesp.br/>)

Abstract

Background

Leishmaniasis is a rapidly expanding zoonosis that shows increasing urbanization. Concern exists regarding the role of wildlife in visceral leishmaniasis (VL) transmission, due to frequent natural or anthropogenic environmental changes that facilitate contact between wildlife, humans and their pets. The municipality of Campinas, in southeastern Brazil, initially recorded VL in 2009, when the first autochthonous case was confirmed in a dog living in an upscale residential condominium, located inside an environmentally protected area (EPA). Since then, disease transmission remains restricted to dogs inhabiting two geographically contiguous condominiums within the EPA.

Methodology/Principal findings

We conducted a cross-sectional study of the VL focus to investigate *Leishmania* spp. infection in domestic dogs, wild mammals and sand flies using molecular tools and recommended serological techniques. Canine seroprevalences of 1.5% and 1.2% were observed in 2013 and 2015, respectively. Six insect species, confirmed or suspected vectors or potential transmitters of *Leishmania*, were identified. Two specimens of the main *L. (L.) infantum* vector in Brazil, *Lutzomyia longipalpis*, were captured in the EPA. Natural infection by *L. (L.) infantum* was recorded in one *Exopallata firmatoi* specimen and two *Pintomyia monticola*. Natural infection by *L. (L.) infantum* and *Leishmania* subgenus *Viannia* was also detected in two white-eared opossums (*Didelphis albiventris*), a known reservoir of VL. Geographical coordinates of each sampling of infected animals were plotted on a map of the EPA,

www.fapesp.br), grant nos. 2014/27212-0, 2014/13049-0 and 2016/02572-0, besides the financial support of the Research Program for the Unified Health System (PPSUS, FAPESP, CNPq—National Council for Scientific and Technological Development No. 12/51267-4. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

demonstrating proximity between these animals, human residences, including the dogs positive for VL, and forest areas.

Conclusions/Significance

The EPA, which is inhabited by humans, has an active VL focus. The risk of establishing and maintaining disease transmission foci in similar scenarios, i.e. wild areas that undergo environmental modifications, is evident. Moreover, different epidemiological profiles of VL must be included to elaborate prevention and control measures that consider the particularities of each transmission area.

Author summary

Leishmaniasis are neglected tropical diseases that represent a major public health problem in the world. New outbreaks have been recorded in the outskirts of some cities and phlebotomine vectors show geographic expansion, potentially associated with environmental and climate changes. We investigated a recent focus of visceral leishmaniasis (VL) in dogs from two residential condominiums located in an environmentally protected area in the municipality of Campinas, São Paulo, southeastern Brazil. The purpose of the study was to investigate *Leishmania (L.) infantum* infection, the etiological agent of the disease, in vector insects (phlebotominae), domestic (dog) and wild hosts. Antibody prevalence was determined in 1.5% and 1.2% of dogs examined in 2013 and 2015, respectively. In addition, natural infection by the VL agent was confirmed in two species of sand flies and two white-eared opossums. All positive animals were captured near human residences and in forest areas. Scenarios like these, with changes in ecosystems and the proximity of wild and domestic animals and humans, can promote the occurrence of zoonoses. The participation of wildlife in the transmission cycle of zoonoses has assumed greater importance in recent years as a result of the consolidation of the One Health concept.

Introduction

In the last 35 years, visceral leishmaniasis (VL) has reemerged as an important public health problem in different parts of the world, with the expansion of transmission and the occurrence of new cases [1].

In the Americas, the disease occurs within a complex network of relationships involving the etiological agent, *Leishmania (Leishmania) infantum* (Synonym: *L. chagasi*) and its different populations: sand flies, mainly of the species *Lutzomyia longipalpis* [2]; domestic or wild vertebrates, sources of vector infection; and susceptible hosts. All of these can be present in a certain time and space, interacting with the particularities of the environment.

Although the dog is considered the main reservoir in the urban environment, it is necessary to consider the possibility of other non-human hosts participating in the maintenance of *L. (L.) infantum* in the endemic environment. These include several species belonging to different orders of wild and/or synanthropic animals, which are naturally infected in several regions and ecotypes [3].

In Brazil, until the mid-1980s VL was considered a disease of primarily wild and rural environments. From the late 1980s onward, epidemics have occurred in the urban environment,

together with rapid expansion of transmission foci in hundreds of municipalities, including populous urban centers and several capitals [4–6]. The rural epidemiological pattern has been modified by increasing urbanization, while the geographic expansion of the disease has been observed in previously safe municipalities [7–10]. Expansion of the spaces occupied by *Lu. longipalpis* has also been verified in endemic urban environments in several regions of the country [11,12].

In the state of São Paulo, southeastern Brazil, VL transmission is also in full expansion. Over a period of 17 years, from 1997 to 2014, the presence of the vector *Lu. longipalpis* has been confirmed in 177 municipalities in the state, with 2,467 autochthonous human cases, 214 deaths and a mortality rate of 8.7% [13,14].

It is currently possible to recognize at least three different transmission patterns and epidemiological profiles of the disease in the state of São Paulo: the first occurs in 76 municipalities and involves both human and canine VL cases, besides the presence of the vector *Lu. Longipalpis*. The second occurs in 47 municipalities, seven of which without records of *Lu. longipalpis*, and involving only canine cases, with no record of human autochthony. Finally, a third pattern involves only human cases, which occurs in nine municipalities, three of which without reports of the vector [13].

Little is known of the dynamics of the expansion of new outbreaks, the environmental and epidemiological determinants of the disease, or the dispersion and behavior of vectors and hosts potentially involved in the different VL transmission cycles. What is known, however, is that increasing environmental degradation of natural and/or anthropogenic origin is a concern in several parts of the world.

The destruction or replacement of the original vegetal cover of a region can alter the composition and interaction of its fauna [15], which can lead to modifications and adaptations in the biology of vectors and hosts of diseases like leishmaniasis.

The initial VL focus in Campinas was identified in 2009, based on an autochthonous canine case reported in an environmentally protected area (EPA) within the municipality [16,17]. This area has undergone intense environmental changes since the 1970s, with deforestation for road and residential condominiums construction.

The epidemiological investigation conducted by the Municipal and State Health Department for the first case of canine VL (CVL) in 2009 determined an anti-*Leishmania* seroprevalence of 2.0% (4/198) in dogs and none of the 40 wild mammals captured in this occasion was positive for *L. (L.) infantum* by polymerase chain reaction (PCR). Sand flies were present in 16/85 (18.8%) residences and *Lu. longipalpis* was verified in three of the 16 (18.8%) houses with the presence of sand flies, being 22.2% of the females positive for *L. (L.) infantum* by PCR [17].

Since it was the first suspected case of autochthony for VL and in order to confirm the occurrence of *L. (L.) infantum* for the first time in this geographic area, at that occasion biological samples collected from dogs diagnosed positive in serological tests were sent to a reference laboratory, the Adolfo Lutz Institute (IAL), which confirms the occurrence of the parasite through isolation in culture medium and molecular tools.

From 2009 to 2016, no human cases have yet been diagnosed in Campinas and notification of canine cases remains geographically restricted to the two contiguous residential condominiums located inside the EPA.

In order to identify the different components involved in the transmission cycle of this CVL focus in Campinas, we conducted a broad epidemiological investigation involving the capture of sand flies and free-living wild animals in other areas of the EPA and integrated this research with the results of canine serological surveys.

Methods

Ethics statement

This research was approved by the Ethics Committee on Animal Use (ECAU) of Campinas State University (protocol no. 3296–1), the ECAU of the Adolfo Lutz Institute and the Pasteur Institute (protocol no. 01/2013) and by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources, through the Biodiversity Authorization and Information System (IBAMA, SISBIO, no. 42926-1/2).

Study area

The municipality of Campinas (22°53'20" S, 47°04'40" W) has approximately one million inhabitants and is located in the southeast region of São Paulo, 100 km from the state capital. In 1993, the Mayor's Office of the municipality of Campinas delimited an area of 223 Km² in the east of the city as an EPA, located between latitudes 22°45'00" and 22°56'00" S and longitudes 46°52'30" and 47°00'00" W [15,18]. This area contains the largest number of forest fragments in the municipality, including several Atlantic Forest remnants, as well as fauna diversity of 68 species of wild mammals, including several endangered species [15,19].

Despite the cultural and biological richness, over the last few decades, the EPA has undergone significant environmental changes, with the implantation of upscale horizontal condominiums, which opened up new roads, established new inhabitants and altered the delimitation of the urban perimeters [15,17,20].

In 2009, the first autochthonous case of CVL in the municipality of Campinas was reported in a dog that lived in one of these residential condominiums inside the EPA, close to residual forest fragments, where contact between the wild fauna, humans and their pets can occur [16,17]. Since then, new canine cases have been reported in this same condominium and in another that is geographically contiguous and shares the same environmental characteristics. The proximity of human residences to these green areas is shown in Fig 1, together with the area of CVL focus in the EPA.

We set traps at 18 different points throughout the EPA to capture vectors and wild animals. These capture points were defined based on criteria that included easy of access by roads, proximity to water courses, size of the forest area, forest connections with urban perimeters and proximity to the CVL focus. They were defined with the help of Google Earth software (Google, version 7.1.2.2041, compiled in 2013).

A serological survey was conducted among domestic dogs in the condominium residences where the CVL focus was located. The sampling points, obtained by GPS (Global Position System), are shown in Fig 2.

The forest fragments and water resources of the EPA were mapped by the Municipal Health Department of Campinas using a geographic information system (GIS) with the MapInfo software, using a matrix layer of an aerial photograph of the region, obtained in 2007. A vector layer was superimposed, which showed the remnants of Atlantic Forest in the state of São Paulo, produced by the project "SOS Mata Atlântica", obtained from the National Institute of Space Research website (INPE, <http://www.inpe.br>). ArcGIS software, v. 10.1 (Environmental System Research Institute, CA), was used to plot the geographic coordinates and draw the maps with all geographic objects and the cartographic base of the municipality available from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE).

Serological survey of domestic dogs

The survey area of canine cases in the EPA was defined based on the VL Surveillance Program of the state of São Paulo, which establishes a radius of 200 m from the confirmed canine case



Fig 1. Study area. Localization of residences in the condominium where the first autochthonous case of canine visceral leishmaniasis was detected in the municipality of Campinas, São Paulo, Brazil, in 2009.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005666.g001>

for conducting surveillance and control actions, and is expanded, whenever necessary, until samples from at least 100 dogs are obtained [21]. In this study, we included blood serum samples collected from all dogs resident in the two condominiums where the CVL focus was located, in addition to areas adjacent to the same (Fig 2).

The serological survey was conducted as part of the planned monitoring and control actions of the Municipal Health Department of Campinas and the IAL, performed in the dog population residing inside the EPA.

After authorization from the owners, data pertaining to the dogs were recorded in a database and serum samples were collected. The serological tests used were those recommended by the National Program for Surveillance and Control of Leishmaniasis: the Dual Path Platform rapid immunochromatographic test (TR DPP, Bio-Manguinhos, Brazil) for screening and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Bio-Manguinhos, Brazil) to confirm the diagnosis, following the manufacturers' protocols.

In this study, we included the surveys conducted in 2013 and 2015, considering that in 2014, there was no supply of kit for canine serological diagnosis from Brazilian Ministry of Health to the Municipal Health Department of Campinas, making it impossible to conduct the serological survey in this year, since this is the official technique for dog survey in Brazil.

Sand fly and wild mammal collection

Sand flies and mammal captures were made monthly from April 2014 to March 2015, for three consecutive nights per month, simultaneously in three different points selected in EPA: one inside the condominiums where there is the CVL focus, another in the forest fragments with no contact with urban areas and a third randomly selected point.

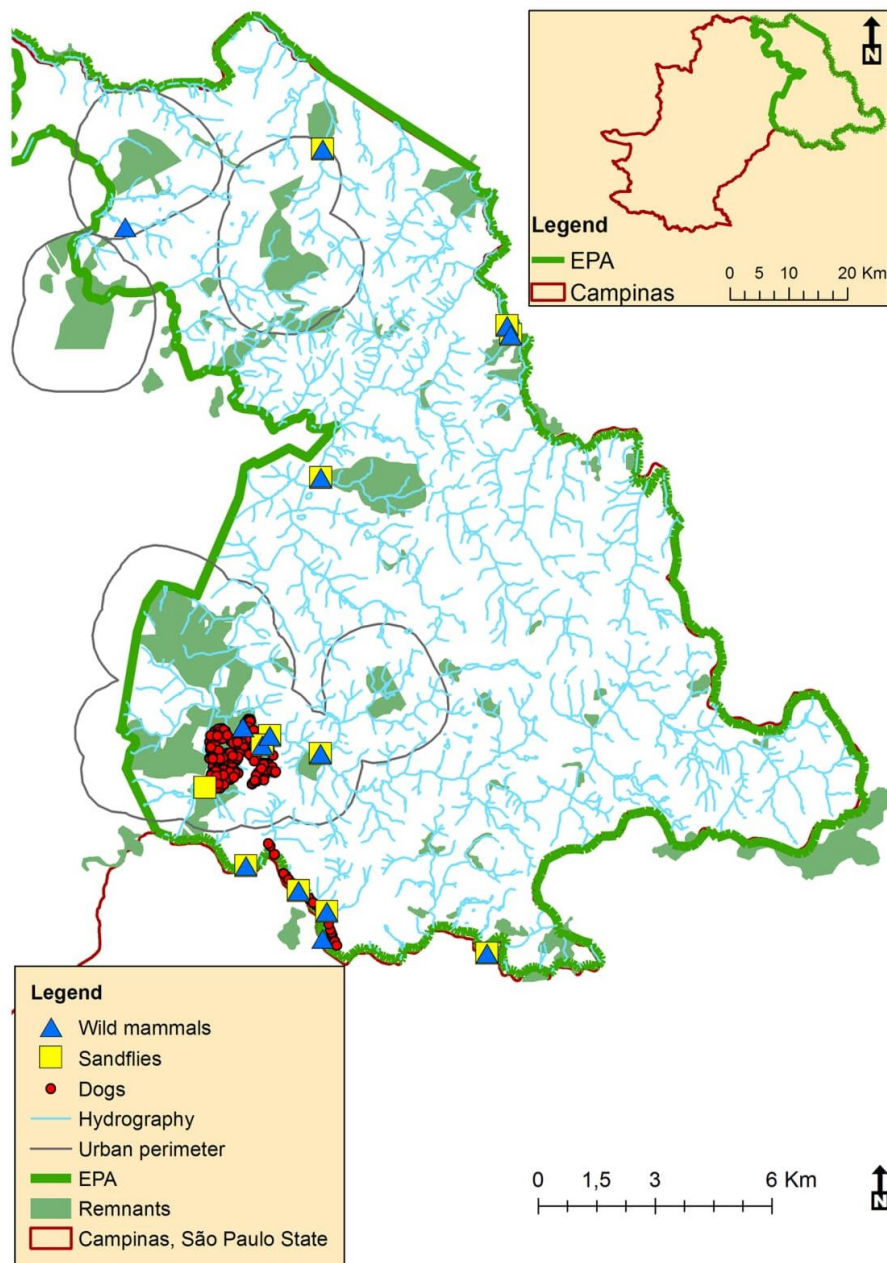


Fig 2. Location of the Campinas environmentally protected area (EPA), São Paulo, Brazil, indicating the sampling points of wild mammals and sand flies in the years of 2014 and 2015 and of dogs in 2013 and 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005666.g002>

For the collection of sand flies we used two or three modified CDC light traps (Horst, Brazil) per point of collection for two or three consecutive nights. The light traps were set up about one meter from the forest ground [22]. Species were classified as proposed by Galati [22] and the abbreviation scheme of genus names was that described by Marcondes [23].

Due to their high morphological resemblance, taxonomic identification of *Brumptomyia* females ended at the genus level. *Evandromyia sallesi* and *Ev. cortezzii* were considered as *Ev. cortezzii-sallei*, based on the intermediate morphological forms observed and the morphological similarity of their females.

Wild mammals were captured for three consecutive nights per month, also from April 2014 to March 2015, using sixty tomahawk traps (Gabrisa, Brazil) with dimensions of 30 x 21 x 20 cm and 55 x 20 x 20 cm, baited with banana and chicken simultaneously at three different points in the EPA. A total of 20 traps per point (totally 60 traps) were distributed along the soil of forest region in linear transects with 10 to 20 meters between the traps [24].

The captured mammals were identified with microchip implants (Microchips Brasil, Brazil), and blood samples were collected by venipuncture during manual containment. Samples were stored at -20°C until DNA extraction.

The capture, containment, handling and sampling of the captured mammals were all carried out according to guidelines for the use of wild mammals in research, as recommended by the American Society of Mammologists [25].

Genomic DNA extraction from samples of sand flies and wild mammals

DNA extraction of total blood samples from wild mammals was performed within 48 h of the conclusion of each capture, using a QIAamp DNA mini kit in a QIAcube DNA extractor (Qiagen, Netherlands).

To measure the quantity and purity of DNA from the samples, we used the NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) equipment. To evaluate the endogenous quality, DNA integrity and the presence of inhibitors in blood samples, we performed PCR reactions using primers for the conserved gene of the interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), IRBP-CF-FWD (5'-TCCAACACCACCACTGAGATCTGGAC-3') and IRBP-CF-REV (5'-GTGAGGAAGAAATCGGACTGGCC-3') [26], or for the $\beta 1$ (5'-ACCACCAACTTCATC CACGTTACC-3') and $\beta 2$ genes (5'-CTTCTGACACAAGTGTGTTCACTAGC-3') [27].

The female sand flies were grouped in pools (1–6 specimens) according to species and location. DNA was extracted using a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Netherlands). The quantity and purity of the DNA samples was measured using an Epoch spectrophotometer (BioTek, Winooski, Vermont).

Detection of *Leishmania* DNA

PCR was performed using the primers LITSR (5' CTGGATCATTTTCCGATG 3') and L5.8S (5' TGATACCACTTATCGCACTT 3') to amplify a 300–350 base pair (bp) fragment from the intergenic region of the *Leishmania* DNA, internal transcribed spacer-1 (ITS-1) [28] and primers Lch14 and Lch15, which amplify a 167 bp of the kinetoplast minicircle DNA of *L. (L.) infantum* [29].

As reaction controls, we used ultrapure water and extracted DNA from *in vitro* cultures of standard strains of *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) and *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN).

The reaction mixture contained 1.3 μ L of buffer (50mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.4), 0.4 μ L MgCl₂ (1.6 μ M), 0.25 μ L of each oligonucleotide (0.2 μ M), 0.25 μ L dNTP (0.2 mM), 0.25 μ L of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil) and 8.3 μ L of ultrapure water,

with 1 μ L of extracted DNA with a minimal concentration of 10 ng/ μ L. Thermal cycling conditions followed those of El Tai et al. (2000) [28] and Silva et al. [29]. The amplified products were identified by 1.5% agarose gel electrophoresis containing 1.0 μ L/10 mL of SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Life Technologies, USA).

Genetic sequencing

Amplified products were purified with the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, UK). Genetic sequencing by the Sanger method was performed in a Genetic Analyzer 3500 automated sequencer using a BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).

The sense and antisense sequences were visualized using Chromas v 2.1.1 software (Technelysium Pty Ltd, Australia), and were submitted to global alignment using MEGA5 software [30] and compared with sequences deposited in the GenBank, using the nucleotide basic local alignment search tool (BLASTn, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Data analysis

The annual anti-*Leishmania* canine seroprevalences in the study area and the respective 95% confidence intervals (95%CI) were calculated. The frequency and percentages of sand flies and wild mammals infected, with their respective 95%CI, were also described. Statistical analysis was performed in Stata software, v. 11.0 (StataCorp LP, USA).

Results

Human residences were observed in close proximity to the forest fragments, where the CVL focus is located inside the Campinas EPA (Fig 1). The distribution of trap sites for capturing sand flies and wild animals is shown in Fig 2, besides domestic dogs sampled.

Fig 3 shows the spatial distribution of seropositive dogs, sand flies and wild mammals naturally infected by species of *Leishmania*, confirmed by molecular techniques.

Serological surveys in dogs

In the canine surveys of 2013 and 2015 were evaluated, respectively, 590 and 571 blood samples from domestic dogs, performing 1,161 examinations (S1 Table). The seroprevalence determined and the respective confidence interval are shown in Table 1.

Phlebotomine sand flies

Four hundred and seventy-seven specimens of sand flies were collected, 291 of which were male and 186 female (S2 Table). Six species known or suspected of being vectors were identified as follows: *Nyssomyia whitmani* (107 males, 47 females), *Migonemyia migonei* (81 males, 34 females), *Pintomyia fischeri* (21 males, 12 females), *Nyssomyia neivai* (12 males, 13 females), *Pintomyia pessoai* (3 males, 1 female) and *Lu. longipalpis* (2 males) (Table 2).

The ITS-1 PCR detected a 300–350 bp fragment in three samples (1.6%; 95%CI 0.3–4.6%) belonging to *Ex. firmatoi* (1/10; 10.0%; 95%CI 0.2–44.5%) and *Pi. monticola* (2/25; 8.0%; 95%CI 1.0–26.0%) that characterized the samples as positive for *Leishmania* genus.

These three samples, one of *Ex. firmatoi* and two of *Pi. monticola*, were also amplified with Lch14/15 primers, producing the expected 167 bp products, later confirmed as *L. chagasi* (synonymous *L. (L.) infantum*) by genetic sequencing that showed 96 to 100% similarity with kinetoplast minicircle sequences deposited in the GenBank (Accession numbers AF308682.1, E values = 2e-37; 2e-50 and 2e-49).

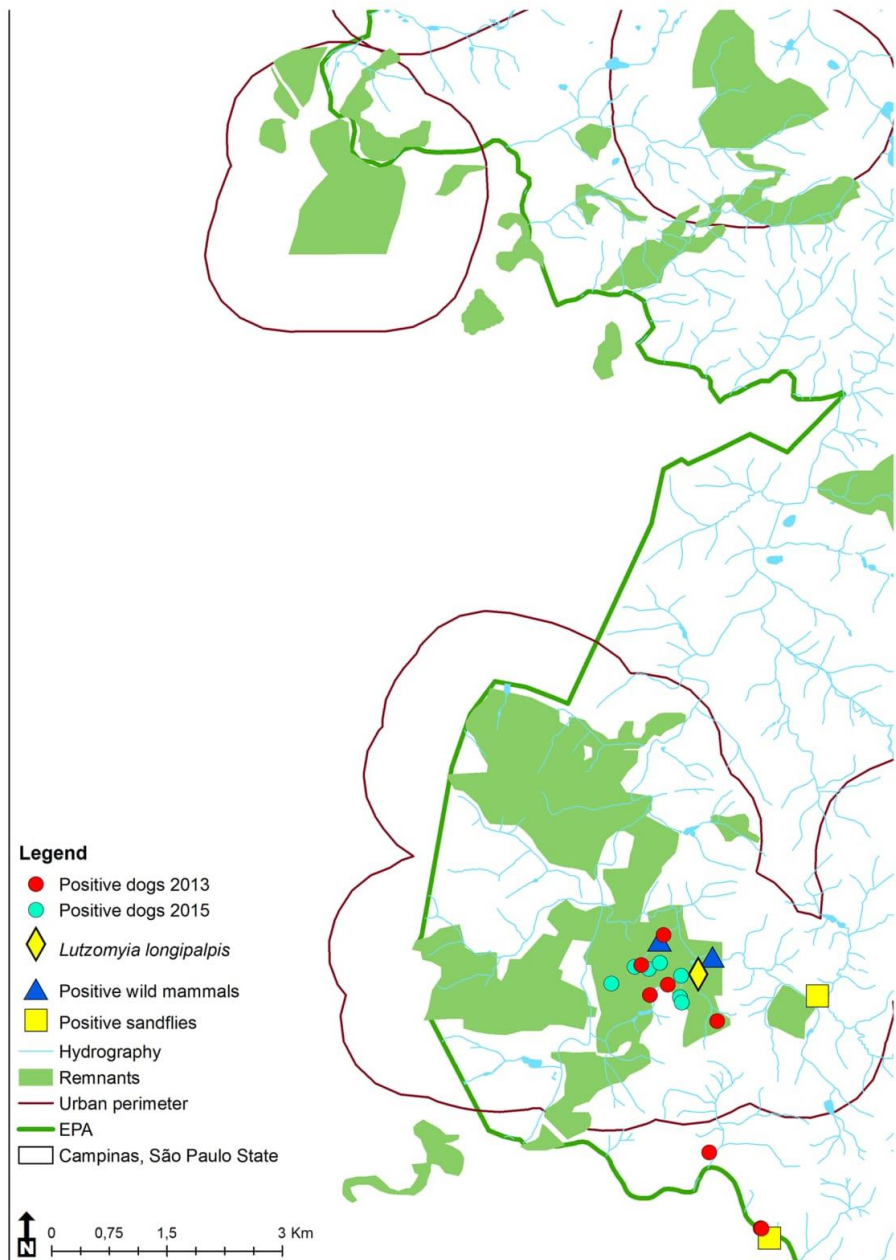


Fig 3. Campinas environmentally protected area (EPA), São Paulo, Brazil, showing the distribution of dogs positive for visceral leishmaniasis in 2013 and 2015 and of wild mammals and sand flies captured in 2014 and 2015 and naturally infected by *Leishmania* spp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005666.g003>

Table 1. Prevalence of anti-*Leishmania* antibodies determined in two canine serological surveys in the Campinas environmentally protected area, 2013 and 2015.

Year	No. of dogs tested	Reactive dogs ^a	Prevalence (%)	Confidence interval (95%)
2013	590	9	1.5	0.5–2.5
2015	571	7	1.2	0.3–2.1
Total	1,161	16	1.4	0.7–2.0

^aDogs that tested positive in screening with the Dual Path Platform rapid immunochromatographic test (TR DPP, Bio-Manguinhos, Brazil) and confirmation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Bio-Manguinhos, Brazil). Data source: Zoonosis surveillance unit (UVZ), Municipal Secretariat of Health, Campinas, SP, Brazil.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005666.t001>

Wild mammals

Eighty-two wild mammals from six species were sampled: 1 *Mazama gouazoubira* (brocket deer; 1.2%), 1 *Sciurus (Guerlinguetus) aestuans* (squirrel; 1.2%), 8 *Callithrix jacchus* (white-tufted-ear marmoset; 9.8%), 11 *Didelphis aurita* (black-eared opossum; 13.4%), 18 *Callithrix penicillata* (black-tufted-ear marmoset; 22.0%) and 43 *Didelphis albiventris* (white-eared opossum; 52.4%). Six (6/82; 7.3%) *D. albiventris* were identified by a microchip reading in a second capture and sampled again (S3 Table).

Amplification of an expected 300–350 bp product was observed in 2/88 (2.3%; 95%CI 0.3–8.0%) samples from *D. albiventris* (2/43; 4.7%; 95%CI 0.6–15.8%). The first amplicon was

Table 2. Phlebotomine sand flies captured monthly using CDC light traps in the Campinas environmentally protected area, São Paulo, Brazil, from April 2014 to March 2015.

Species	Number of specimens			Relative % M/F
	Males	Females	N total	
<i>Brumptomyia</i> sp.	52	43	95	19.92
<i>Evandromyia cortezezzii-sallesii</i>	3	2	5	1.05
<i>Evandromyia edwardsi</i>	0	1	1	0.21
<i>Evandromyia lenti</i>	0	1	1	0.21
<i>Expapillata firmatoi</i>	2	8	10	2.10
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2	0	2	0.42
<i>Migonemyia migonei</i>	81	34	115	24.11
<i>Nyssomyia neivai</i>	12	13	25	5.24
<i>Nyssomyia whitmani</i>	107	45	152	31.87
<i>Pintomyia fischeri</i>	21	12	33	6.92
<i>Pintomyia monticola</i>	2	23	25	5.24
<i>Pintomyia pessoai</i>	3	1	4	0.84
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	1	1	0.21
<i>Psathyromyia pascalei</i>	5	2	7	1.47
<i>Psychodopygus ayrozai</i>	1	0	1	0.21
Total	Number	291	186	477
	%	61.01	38.99	-
				100

PCR tests were performed on all 186 sand fly females, grouped in 74 pools (14 *Brumptomyia* sp., 2 *Evandromyia cortezezzii-sallesii*, 1 *Ev. edwardsi*, 1 *Ev. lenti*, 6 *Expapillata firmatoi*, 11 *Mg. migonei*, 3 *Ny. neivai*, 13 *Ny. whitmani*, 6 *Pi. fischeri*, 13 *Pi. monticola*, 1 *Pi. pessoai*, 1 *Psathyromyia aragaoi*, 2 *Pa. pascalei*), aimed at investigating the rate of natural infection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005666.t002>

confirmed as *L. (L.) infantum* and the second as *Leishmania* subgenus *Viannia*, making both the first records of infection by *Leishmania* species in wild mammals in this region [31].

In a third *D. albiventris* sample, a 500 bp product was confirmed as *Trypanosoma rangeli* by genetic sequencing (98% similarity; E value = 0.0, GenBank accession number AY230237.1 and others). No sample was positive when using the primers Lch14/15.

Discussion

Participation of wild fauna in transmission cycles of VL

The presence of natural infection by *L. (L.) infantum* in female sand flies and natural infection by two *Leishmania* species in a mammal species considered to be a potential reservoir (*D. albiventris*) provides strong evidence that sylvatic *Leishmania* transmission cycle is occurring in the EPA. However, it was not possible to confirm whether VL in Campinas occurred due to a wild enzootic cycle of transmission. Since dogs cohabit with infected wild animals, the hypothesis of the infection of wild mammals by infected dogs cannot be ruled out.

In the investigation conducted into the first case of CVL in the EPA in 2009, 40 wild mammals belonging to the species *Nectomys squamipes*, *D. albiventris*, *C. penicillata* and *Gracilianus agilis* were captured in wooded areas of the EPA and samples were examined by PCR, but none presented positive for VL [17]. In our investigation, infection among wild fauna by different species of *Leishmania* [31] was confirmed for the first time in this region, together with another species of trypanosomatid, *T. rangeli*. In addition, at the time of the first investigation, proximity of 100 m between human residences and forest areas where sand flies and wild mammals were captured was demonstrated [17].

In our study, although the capture of wild animals and phlebotominae was conducted in forest fragments in several locations within the EPA, the occurrence of *L. (L.) infantum* in these animals was observed only in locations close to seropositive domestic dogs. This spatial distribution suggests the involvement of these animals in the CVL focus, even though low *Lu. longipalpis* density and a small number of infected wild animals was observed.

Some authors suggest that the public health impact of VL infected dogs in urban areas is greater than in rural and wild regions, and that attention should be given to individuals living or frequenting these locations. Restricted contact between wildlife and domestic dogs has also been proposed to reduce the probability of VL transmission to humans and wild animals from dogs [32,33].

Discussion concerning the participation of wild species in the transmission of zoonotic parasites has become particularly important in recent years with the consolidation of the One Health concept [34,35]. Anthropogenic changes in ecosystems are particularly important in this context, resulting in greater proximity between wild and domestic animals and humans [36].

Environmental degradation and proximity between wildlife and humans and their domestic animals

Proximity to forest areas and wildlife with human residences is a worrying scenario. In the state of Rio de Janeiro, dogs living within 100 m of forests presented a 3.5-fold higher risk of acquiring VL. The presence of opossums in the peridomicile increased the chances of infection in dogs 2.6-fold, with a 30.0% prevalence in these wild animals [37].

Another study detected a 20% prevalence of VL in dogs from rural areas in the state of Minas Gerais, located up to 2 Km from five EPAs that contained fragments of Atlantic Forest. The risk factors for these dogs were different from those living in urban areas [33].

In the Chaco region of Argentina, Barroso et al. [38] surveyed 77 dogs living in a forest area where two cases of human VL had occurred and determined a 13% prevalence. The authors suggested that the emergence of cases in dogs and humans in a wild region that was endemic for tegumentary leishmaniasis, with a relatively low canine prevalence, is clearly compatible with the involvement of wild mammals as reservoirs and that parasite transmission occurs from these animals. This scenario is very similar to the CVL focus located in the Campinas EPA.

Sand fly fauna in the Campinas EPA

In the EPA, the presence of 15 phlebotomine sand flies species, even at low frequencies, shows a diversity of fauna, as previously reported in forest environments [39,40].

One interesting factor is the low density of *Lu. longipalpis* in the study area. Based on analysis of sexual pheromones secreted by males, it is accepted that *Lu. longipalpis* is a species complex [41]. The chemotype population of *Lu. longipalpis* found in Campinas, cembrene-1, is different to the chemotype population found in the western region of the state of São Paulo, (S)-9-methylgermacrene-B [42]. The remarkable differences between the epidemiological situations, population size and sibling complex of *Lu. longipalpis* in Campinas, corroborates the findings of Casanova et al. [43], who suggested there are different vectorial capacities and competence between siblings.

In this study, two species of phlebotomine sand flies, *Pi. monticola* and *Ex. firmatoi*, were found naturally infected with *L. (L.) infantum*. These species are essentially sylvatic and highly anthropophilic [44,45]. The participation of these species in the transmission of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) infantum* has been suggested in the municipalities of Divinópolis, Minas Gerais, and in Rio de Janeiro, respectively, with *Pi. monticola* and *Ex. firmatoi* [46,47].

Females of different species were also found naturally infected by *L. (L.) infantum* in other endemic areas, such as specimens belonging to the *cortelezzii* complex in the Brazilian States of Minas Gerais and Mato Grosso do Sul—which are not amongst the incriminated leishmaniasis vector—and may be involved in a wild or rural cycle of *L. (L.) infantum* transmission in these areas [48,49]. *Mg. migonei*—a known vector of cutaneous leishmaniasis—was also found naturally infected in the Brazilian States of Pernambuco and Ceará. Some authors suggested that this species could act as a potential vector in VL transmission, particularly in areas where *Lu. longipalpis* is absent [50,51]. It is important to note that recent studies have demonstrated the high susceptibility of *Mg. migonei* to infection with *L. (L.) infantum*, reinforcing this hypothesis [52,53].

The detection of *Leishmania* DNA in a sand fly species does not prove vector competence [54]. We cannot exclude the persistence of DNA without any infective role, particularly because there are infected dogs and wild animals in the vicinity of these infected sand flies [55]. However, these results reinforce the need for further studies to investigate the vectorial capacity of these species, especially experimental studies.

Particularities of VL focus in the study area

Although canine VL cases usually precede the occurrence of the disease in humans, no cases of human VL have been recorded in Campinas city to date. This fact could be associated with the local transmission characteristics related to the diversity and competence of the vectors, the presence of wild reservoirs and hosts, the characteristics of the parasite (not investigated), as well as the pattern of human contact, with transmission in sparsely populated area and in luxury condominiums.

The hypothesis that in some new VL foci in the state of São Paulo, subpopulations of *Lu. longipalpis* could be present and account for the existence and perpetuation of *L. (L.) infantum* enzootic wild cycles should be considered, particularly in areas around preserved forest environments or in recent residential projects.

On the other hand, Motoie et al. [56] identified the presence of genetically distinct populations of *L. (L.) infantum* in São Paulo, indicating that the inherent characteristics of the parasite itself could also be responsible for different epidemiological patterns of VL observed in new foci in the state.

In addition to factors directly associated with the transmission cycle, the occurrence of CVL cases in the Campinas EPA seems to be related to the occupation process, in which anthropic activities changed the natural landscapes, which has forest fragments containing wild fauna. In these regions, the exposure of humans and their pets to parasites and vectors of diseases to which they have not been previously exposed can result in disease outbreaks from natural enzootic foci.

The process of urban expansion within the EPA in the 1970s and 1980s was associated with an outbreak of cutaneous leishmaniasis in human inhabitants of the EPA in 1993 and 1994 [20]. In our study, an opossum was infected with a species of the subgenus *Viannia*, known to be responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil, which confirms the current risk of infection in this area and, again, the possible involvement of the wild fauna in the maintenance of the transmission cycle.

In addition, environmental modifications seem to be related to the adaptation of phlebotomine vectors to urban environments due to a decrease in the availability of wild animals as a food source, making dogs and humans more accessible alternatives to the vector [21,57].

Particularities of different areas of VL transmission versus prophylaxis and disease control

The VL Surveillance and Control Program in Brazil supervises the main actions to reduce morbidity and lethality, aimed at early diagnosis and treatment of human cases, vector control and identification and elimination of seropositive domestic dogs [57]. Although there is good theoretical support for these measures, there is no evidence of their effectiveness in reducing the prevalence in endemic regions nor in the expansion of new outbreaks [58–60].

In Europe, although the domestic dog is considered the main reservoir in endemic areas, wild reservoirs have been proposed as potentially responsible for the lack of success in VL control [61]. In Brazil, the zoonotic transmission cycle is concentrated in areas where human habitation is located close to the wild cycle of the disease [2].

Although serological tests may be subject to false positive and/or negative results, due to its sensitivity and specificity, their use is valued for epidemiological surveillance purposes [22, 53].

Despite the serological tests used in this study, Grimaldi Jr. et al. [62] reported that DPP displayed high specificity (96%) but low sensitivity (47%) in identify asymptomatic dogs, but the sensitivity was significantly higher (98%) in diseased cases, indicating that this convenient test may be useful to identify the most infectious dogs.

In another study, Laurenti et al. [63] report that DPP detected both asymptomatic and symptomatic dogs in equal proportions. Using this test, 42/47 (89.4%) symptomatic dogs were detected positive, besides 35/38 (92.1%) asymptomatic dogs, with good accuracy of 92.7%. The ELISA BioManguinhos was positive in 43/47 (91.5%) symptomatic dogs and 34/38 (89.5%) asymptomatic dogs, with accuracy of 84.3%. Although, the combination of the two tests, as used in our study and in Brazilian surveillance activities, results in 99.1% sensitivity and 73.9% specificity, showing that it is a useful serology protocol for surveys.

In our study, the proximity of seropositive dogs housing sites with capture sites of wild mammals and sandflies infected with *Leishmania* spp. reinforces the assumption that they may be related. However, as shown in Fig 1, the human residences were constructed in the middle of the vegetation, being difficult to delimit the occurrence of independent transmission cycles in peridomiciliar or wild environment.

The need to elaborate distinct control and prophylaxis strategies, according to the characteristics of each transmission area, including the rural and wild areas in the control programs is now becoming evident. Studies that clarify the patterns of infection in different locations are useful for the success of such actions. Thus, investigating a new VL focus in all its distinct aspects contributes to our understanding of the key elements of the transmission dynamics and disease control. Actions that do not consider these particularities are less likely to succeed.

Supporting information

S1 Table. Data from domestic dogs studied in the transmission area of canine visceral leishmaniasis. Campinas Environmentally Protected Area, 2013 and 2015.
(XLSX)

S2 Table. Data from sand flies studied. Campinas Environmentally Protected Area, April 2014 to March 2015.
(XLS)

S3 Table. Data from wild mammals studied. Campinas Environmentally Protected Area, April 2014 to March 2015.
(XLS)

S1 Checklist. For cross-sectional studies.
(PDF)

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the staff of the Surveillance Unit of Zoonosis of the Campinas Municipal Health Secretariat and of the Adolfo Lutz Institute for their technical support, especially in the fieldwork.

Author Contributions

Conceptualization: MRD LMP VGdS VBRP APBVZ CLC GM RMH JET.

Data curation: LMP VGdS CLC GM.

Formal analysis: MRD LMP.

Funding acquisition: MRD LMP JET.

Investigation: LMP VGdS VBRP CLC GM RMH JET.

Methodology: MRD LMP VGdS VBRP CLC JET.

Project administration: MRD JET.

Resources: MRD VBRP JET.

Software: MRD LMP CLC.

Supervision: MRD LMP VGdS APBVZ CLC JET.

Validation: LMP VGdS VBRP GM RMH JET.

Visualization: MRD LMP VGdS CLC.

Writing – original draft: MRD LMP VGdS JET.

Writing – review & editing: MRD LMP VGdS VBRP APBVZ CLC GM RMH JET.

References

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012; 7: e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671> PMID: 22693548
- WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 22–26 March, 2010. WHO Tech Rep Ser. 2010.
- Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2014; 3(3): 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004> PMID: 25426421
- Costa CHN, Pereira HF, Araújo M V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980–1986. Rev Saude Publica. 1990; 24(5): 361–372. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101990000500003> PMID: 2101528
- Costa JML, Viana GMC, Saldanha ACR, Nascimento MDSB, Alvim AC, Burattini MN, et al. Leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil. A evolução de uma epidemia. Cad Saude Publica. 1995; 11(2): 321–324.
- de Araújo VEM, Morais MHF, Reis IA, Rabello A, Carneiro M. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001511> PMID: 22347514
- de Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saude Publica. 1994; 10(Suppl.2): 359–375. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1994000800014>
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95(3): 239–243. PMID: 11490989
- Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCP. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. Arq Bras Med Vet Zootec. 2001; 53(1): 1–8. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000100001>
- Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7(3): 338–349. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>
- Souza GD, dos Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(8): 1181–1182. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800017> PMID: 20140381
- Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2008; 24(12): 2948–2952. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200025> PMID: 19082287
- de Ciaravolo RMC, de Oliveira SS, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Viviani A Junior, et al. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral no estado de São Paulo, dezembro de 2014. Bol Epidemiológico Paul. 2015; 12(143): 9–22.
- Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araújo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, et al. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico de uma doença emergente em terras paulistas. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32 (supl.): 218.
- Seplama. Secretaria de Planejamento e Meio Ambiente. Plano de gestão da área de proteção ambiental da região de Sousas e Joaquim Egídio, APA municipal. 1996. 177p. <http://www.campinas.sp.gov.br/governo/seplama/planos-locais-de-gestao/doc/plgapa.pdf>
- Savani EMM, Presotto D, Roberto T, de Camargo MCGO, Nicoletti DSR, Sacramento DV. First occurrence of an autochthonous canine case of *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi in the municipality of Campinas, State of São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2011; 53(4): 227–229. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652011000400010> PMID: 21915468

17. von Zuben APB, Angerami RN, Castagna C, Baldini MBD, Donalisio MR. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(3): 385–388. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0126-2013> PMID: 25075492
18. Mattos C de O. Contribuição ao planejamento e gestão da Área de Proteção Ambiental de Sousa e Joaquin Egídio, Campinas, SP. M.Sc. Thesis, Universidade de São Paulo. 1996. <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000183299>
19. PMC. Prefeitura Municipal de Campinas. Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas. 2009. <http://www.apacampinas.cnpm.embrapa.br>. Cited 3 Sep 2013.
20. Corte AA, Nozawa MR, do Ferreira MC, Pignatti MG, Rangel O, Lacerra SS. Aspectos eco-epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas. *Cad Saude Publica*. 1996; 12(4): 465–472. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1996000400004>
21. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenação de Controle de Doenças. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo. São Paulo: A Secretaria; 2006.
22. Galati EAB. Classificação de Phlebotominae. In: Rangel EF, Lainson R, editors. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2003.
23. Marcondes CB. A Proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the World. *Entomol News*. 2007; 118(4): 351–356. [https://doi.org/10.3157/0013-872X\(2007\)118\[351:APOGAS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3157/0013-872X(2007)118[351:APOGAS]2.0.CO;2)
24. Cardoso RM, de Nadjar NSLA, Romero GAS, Souza TTCM, Dietrich AG, Mender JD, et al. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 171. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0780-y> PMID: 25889365
25. Sikes RS, Gannon WL. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal*. 2011; 92(1): 235–253. <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1>
26. Ferreira EC, Gontijo CM, Cruz I, Melo MN, Silva AM. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105(7): 895–898. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700009> PMID: 21120359
27. Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. *Br J Biomed Sci*. 2001; 58(2): 85–91. PMID: 11440211
28. el Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönián G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94(5): 575–579. PMID: 11132393
29. Silva RC, Richini-Pereira VB, Kikuti M, Marson PM, Langoni H. Detection of *Leishmania* (L.) infantum in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Vet Q*. 2017; 37(1): 23–30. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1252073> PMID: 27774854
30. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28(10): 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121> PMID: 21546353
31. Paiz LM, Donalisio MR, Richini-Pereira VB, Motoie G, Castagna CL, Tolezano JE. Infection by *Leishmania* spp. in free-ranging opossums (*Didelphis albiventris*) in an environmentally protected area inhabited by humans in Southeastern Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2016; 16(11): 728–730. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2001> PMID: 27631688
32. de Curi NHA, Miranda I, Talamoni SA. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(1): 99–101. PMID: 16699717
33. de Curi NHA, de Paschoal AMO, Massara RL, Marcelino AP, Ribeiro AA, Passamani M, et al. Factors associated with the seroprevalence of leishmaniasis in dogs living around Atlantic Forest fragments. *PLoS One*. 2014; 9(8): e104003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104003> PMID: 25089629
34. Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2011; 4: 197. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197> PMID: 21985335
35. Bidaisee S, Macpherson CNL. Zoonoses and one health: a review of the literature. *J Parasitol Res*. 2014; 2014: 874345. <https://doi.org/10.1155/2014/874345> PMID: 24634782
36. Thompson RC. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *Int J Parasitol*. 2013; 43(12–13): 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.007> PMID: 23892130
37. Cabrera MA, Paula AA, Camacho LA, Marzochi MC, Xavier SC, da Silva AV, et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Med trop Sao Paulo*. 2003; 45(2): 79–83. PMID: 12754572

38. Barroso PA, Marco JD, Locatelli FM, Cardozo RM, Hoyos CL, Mora MC, et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: possible reservoirs and vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 93(2): 334–339. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0267> PMID: 26055744
39. Pereira Jr. AM. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e taxa de infecção natural por *Leishmania* Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em ambientes de várzea e de terra firme no município de Tefé, Amazonas, Brasil. M.Sc. Thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 2014. <http://bdtd.inpa.gov.br/handle/tede/1535>
40. Andrade Filho JD, Carneiro APS, Lima MLN, Santiago RM, Gama MA, Santos CA, et al. Flebotomíneos de Timóteo, Estado de Minas Gerais, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Cad Saude Publica*. 1997; 13(4): 767–770.
41. Watts PC, Hamilton JG, Ward RD, Noyes HA, Souza NA, Kemp SJ, et al. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 73(4): 734–743. 73/4/734 PMID: 16222018
42. Casanova C, Colla-jacques FE, Hamilton JG, Brazil RP, Shaw JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(3): e0003620. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003620> PMID: 25781320
43. Casanova C, Hamilton JGC, Trigo JR, Costa AIP. Identification of sex pheromones of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) populations from the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(1): 113–115. PMID: 16699721
44. Galati EAB, Marassá AM, Gonçalves-Andrade RM, Consales CA, Bueno EFM. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in the Speleological Province of the Ribeira Valley: 2. Parque Estadual do Alto Ribeira (PETAR), São Paulo State, Brazil. *Rev Bras Entomol*. 2010; 54(3): 477–487.
45. Gomes AC, Barata MS, Rocha e Silva EO, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 6. Fauna flebotomínica antropofílica de matas residuais situadas na região centro-nordeste do Estado de São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989; 31: 32–39.
46. de Souza MB, de Marzochi MCA, de Carvalho RW, Ribeiro PC, dos Pontes CS, Caetano JM, et al. Ausência da *Lutzomyia longipalpis* em algumas áreas de ocorrência de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica*. 2003; 19(6): 1881–1885. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2003000600033>
47. Margonari C, Soares RP, Andrade-Filho JD, Xavier DC, Saraiva L, Fonseca AL, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and *Leishmania* infection in Gafanhoto Park, Divinópolis, Brazil. *J Med Entomol*. 2010; 47(6): 1212–1219. <https://doi.org/10.1603/ME09248> PMID: 21175074
48. Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-Endemic area of Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2008; 8(3): 407–414. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0180> PMID: 18429695
49. Saraiva L, Carvalho GML, Gontijo CMF, Quaresma PF, Lima ACVMR, Falcão AL, et al. Natural infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J Med Entomol*. 2009; 46(5): 1159–1163. <https://doi.org/10.1603/033.046.0525> PMID: 19769049
50. de Carvalho MR, Valença HF, da Silva FJ, de Pita-Pereira D, de Pereira TA, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonomys migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop*. 2010; 116: 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.009> PMID: 20457120
51. Rodrigues ACM, Melo LM, Magalhães RD, de Moraes NB, de Souza AD, Bevilacqua CML. Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Vet Parasitol*. 2016; 220: 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.018> PMID: 26995718
52. Guimarães VCFV, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Brandão Filho SPB, et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*. 2016; 9: 159. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2> PMID: 26988559
53. Galvis-Ovallos F, da Silva MD, da Bispo GBS, de Oliveira AG, Neto JRG, dos Mafafrente RS, et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite*. 2017; 24: 2. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017002> PMID: 28134092
54. Seblova V, Sadlova J, Carpenter S, Volf P. Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 222. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-222> PMID: 24884857
55. Senghor MW, Niang AA, Depaquit J, Féré H, Faye MN, Elguero E, et al. Transmission of *Leishmania infantum* in the canine leishmaniasis focus of Mont-Rolland, Senegal: ecological, parasitological and

- molecular evidence for a possible role of *Sergentomyia* sand flies. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(11): e0004940. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004940> PMID: 27806051
56. Motoie G, Ferreira GE, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus micro-satellite typing directly in dog infected tissues. Infect Genet Evol. 2013; 18: 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.031> PMID: 23665466
 57. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2014.
 58. Werneck GL, de Pereira TJCF, de Carvalho FAA, Costa CHN, Gouvêa MV, Chaves FC, et al. Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial 2004. Epidemiol Serv Saúde. 2008; 17(2): 87–96.
 59. A Costa FAL. The dog as a risk factor in transmission of visceral leishmaniasis: a review. Adv Infect Dis. 2012; 2: 37–47. <https://doi.org/10.4236/aid.2012.22006>
 60. von Zuben APB, Donalísio MR. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. Cad Saude Publica. 2016; 32(6): e00087415. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00087415>
 61. Millán J, López-roig M, Cabezón O. Absence of *Leishmania infantum* in cave bats in an endemic area in Spain. Parasitol Res. 2014; 113(5): 1993–1995. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3855-3> PMID: 24623348
 62. Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I de-S, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012; 106: 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001> PMID: 22137538
 63. Laurenti MD, de Leandro MVS Jr, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, et al. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 2014; 205: 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002> PMID: 25257505

APÊNDICE 3: Documento elaborado em parceria com a Unidade de Vigilância em Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura Municipal de Campinas, São Paulo, e entregue à comunidade nos locais de captura de mamíferos silvestres.



INFORME À COMUNIDADE **PESQUISA EM ANIMAIS SILVESTRES**

A **Universidade Estadual de Campinas**, Departamento de Saúde Coletiva, em parceria com o **Instituto Adolfo Lutz de São Paulo-SP** e o **Centro de Controle de Zoonoses de Campinas-SP**, estão realizando um projeto que pesquisa sobre a “**leishmaniose visceral**” em animais (mamíferos) silvestres que vivem nas regiões de mata da Área de Proteção Ambiental (APA) do Município de Campinas, que está localizada nos subdistritos de **Sousas e Joaquim Egídio**.

A **leishmaniose visceral** é uma doença grave, classificada como zoonose por afetar o ser humano e diferentes espécies de animais mamíferos, incluindo os cães e diferentes mamíferos silvestres, como os gambás e raposas. A doença é transmitida pela picada de um mosquito denominado **flebotomíneo** (*Lutzomyia longipalpis*; *Lutzomyia cruzi*), conhecido como **mosquito-palha ou birigui**, que ao picar o animal ou o homem pode transmitir o protozoário causador da doença, cujo nome é **Leishmania infantum**.

No homem, os sintomas mais comuns são febre e aumento de órgãos abdominais, como fígado e baço, e pode evoluir para quadros graves se não for diagnosticada e tratada oportunamente. **O cão** pode não apresentar nenhum sinal da doença, ou poucos sinais, como emagrecimento e perda do brilho nos pelos. Alguns cães apresentam a doença de forma grave, com emagrecimento, feridas na pele, queda de pelo ao redor do olho, aumento do tamanho das unhas, conjuntivite e paralisia das patas traseiras. O diagnóstico por meio de exames deve ser feito rapidamente nos cães, pois estes podem servir como reservatórios para o mosquito que transmite a doença.

No município de **Campinas** a leishmaniose visceral foi diagnosticada pela primeira vez no ano de 2009, em um cão no subdistrito de Sousas. Desde então, a doença já foi transmitida para outros cães nessa região. São feitos diversos trabalhos para evitar que a transmissão da doença aumente, como o exame dos cães, colocação de coleira repelente e pesquisa do mosquito transmissor.

O Projeto de Pesquisa que está sendo realizado é de grande **importância**, pois os animais silvestres nessa região da APA estão muito próximos do contato com ambiente urbano (casas, condomínios, fazendas, etc.) e a presença de animais positivos para o



parasita *Leishmania infantum* pode servir como uma fonte de infecção ao mosquito, que poderá transmitir a doença. Assim, investigando esses animais, os pesquisadores procuram esclarecer qual a situação atual da doença na região, para que possam continuar a serem tomadas medidas de controle da doença de forma correta.

É importante destacar que:

- Os animais silvestres a serem examinados pelo Projeto de Pesquisa são capturados na mata com armadilhas próprias para essa atividade. Se algum animal entrar em uma armadilha, é realizada a colheita de material biológico (sangue) do animal por um **Médico Veterinário** que participa da equipe e está preparado para realizar os procedimentos. Se necessário, os animais são anestesiados;
- Depois da colheita de material biológico, os animais são marcados com microchips e **devolvidos à natureza**, sendo soltos no **mesmo local** onde foram capturados;
- Todos os procedimentos realizados no projeto, incluindo a captura, colheita de material e marcação dos mamíferos silvestres são realizados **com autorização** do:
 - ✓ **Comitê de Ética** da Universidade Estadual de Campinas (autorização nº 3296-1);
 - ✓ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (**IBAMA**), pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (autorização nº 42926-1/2);
 - ✓ **Conselho Gestor da Área de Proteção Ambiental** do município de Campinas (CONGEAPA), que foi notificado quanto à realização das atividades na região;

Algumas regiões de mata estão localizadas dentro de propriedades privadas, como condomínios e fazendas, sendo necessária autorização do responsável para que a equipe entre na mata e realize seu trabalho.

A equipe se coloca à disposição da comunidade para esclarecer maiores dúvidas e informações:

- Maria Rita Donalísio Cordeiro – Dpto. de Saúde Coletiva -Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP – (19) 3521-8036
- Cláudio Castagna, Médico Veterinário, Centro de Controle de Zoonoses – SMS –Campinas – (19) 3245-1219

Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas – Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Campinas - SP – Brasil – CEP: 13.083-887

APÊNDICE 4: Informe ao Conselho Gestor da Área de Proteção Ambiental Municipal de Campinas (CONGEAPA), protocolado na Prefeitura Municipal de Campinas, São Paulo.

Campinas, 15 de Março de 2014

Ao: Conselho Gestor da Área de Proteção Ambiental (APA) Municipal de Campinas, São Paulo.

Referente: Solicitação de Manifestação de Ciência e Concordância de execução de Projeto de Pesquisa Científica na APA de Campinas.

Solicitante: Profª Drª Maria Rita Donalísio Cordeiro (Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)

14/10/11977 PG

14 MAR 2014

Vimos por meio desta solicitar ao Conselho manifestação de ciência e concordância quanto ao desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado **“Infecção por *Leishmania chagasi* em mamíferos silvestres de vida livre em região de mata nativa, no município de Campinas, São Paulo”**, a ser executado, sob minha orientação e responsabilidade, pela aluna de Mestrado em Saúde Coletiva, área de concentração Epidemiologia, Laís Moraes Paiz, no período de março de 2014 a março de 2016 na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O projeto tem por objetivo avaliar a presença de infecções por *Leishmania chagasi* em mamíferos silvestres de vida livre da Área de Proteção Ambiental (APA) do município de Campinas, localizada nos subdistritos de Sousas e Joaquim Egídeo, estado de São Paulo. Nesta região foi detectado o primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina (LVC) do município no ano de 2009, que atualizou a situação epidemiológica de Campinas para “município com transmissão canina”. Ressalta-se a necessidade de ações de vigilância e controle na região, especialmente devido à grande importância da enfermidade para a Saúde Pública. Assim, a investigação da infecção em mamíferos pertencentes à mata nativa onde o primeiro caso canino foi notificado poderá sugerir a ocorrência de um ciclo silvestre da doença e contribuir na elucidação dos mecanismos de introdução e transmissão da leishmaniose visceral em Campinas.

